

Caracterización estructural y fisiológica del proceso de embriogénesis somática en azafrán (*Crocus sativus* L.)

Trabajo presentado por
Silvia Blázquez Martín
Para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biológicas por la universidad de
Castilla La Mancha

Directores
Dr JOSÉ ANTONIO FERNÁNDEZ PÉREZ
Dr ABEL PIQUERAS CASTILLO

Silvia Blázquez Martín

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y
FISIOLÓGICA DEL PROCESO DE
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AZAFRÁN
(*Crocus sativus* L.)**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM
84-8427-377-6



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2005

**Caracterización estructural y
fisiológica del proceso de
embriogénesis somática en azafrán
(*Crocus sativus* L.)**

Silvia Blázquez Martín

2004



Deseo agradecer su colaboración a todas las personas que me han ayudado de una u otra forma durante la realización de esta tesis y especialmente a mi familia y amigos por apoyarme en los momentos más difíciles

ÍNDICE.

ABREVIATURAS.....	I
-------------------	---

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Azafrán	
1.1.1. Características de la planta, ciclo biológico y origen.....	1
1.1.2. Pasado y presente del cultivo de azafrán en el mundo.....	4
1.1.3. Cultivo de azafrán en España y Castilla la Mancha.	5
1.1.4. Problemas del cultivo en España.....	7
1.1.5. Cultura del azafrán.....	10
1.1.6. Usos.....	11
1.1.7. Mejora clásica en azafrán.....	12
1.2. Micropropagación	
1.2.1. Introducción.....	13
1.2.2. Etapas en micropropagación	13
1.2.3. Alternativas en morfogénesis <i>in vitro</i>	17
-Cultivo de brotes axilares.....	17
-Cultivo de meristemos.....	18
-Cultivo de protoplastos.....	18
1.2.4. Alternativas al cultivo en medio sólido: Cultivos en medio líquido.....	19
1.2.5. Embriogénesis somática	
1.2.5.1. Introducción.....	24
1.2.5.2. Estudios histológicos.....	27
1.2.5.3. Desarrollo de los Embriones	
1.2.5.3.1. Medio de cultivo.....	28
1.2.5.3.2. Reguladores del crecimiento vegetal.....	29
1.2.5.4. Biología molecular en embriogénesis.....	35
1.3. Evolución del sistema enzimático antioxidante durante el proceso de embriogénesis.....	39
1.4. Poliaminas en embriogénesis.	
1.4.1. Introducción.....	42
1.4.2. Poliaminas y embriogénesis.....	43
1.4.3. Poliaminas y ácido jasmónico.....	45
1.4.4. Poliaminas y estrés.....	45
1.5. Manipulación genética.	
1.5.1. Introducción.....	47
1.5.2. Naturaleza del explante y condiciones de cultivo.....	49
1.5.3. Regeneración de plantas completas.....	49
1.5.4. Manipulación genética de plantas con bulbos y cormos.....	49

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....51

CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal.....53

2.1. Desarrollo de un protocolo de embriogénesis somática en azafrán

2.1.0. Obtención de callos embriogénicos

2.1.0.1. Selección del explante.....53

2.1.0.2. Condiciones experimentales.....54

2.1.1. Experimentos en medio sólido

2.1.1.1. Multiplicación de embriones: generación de material nodular.....54

2.1.1.1.1. Primer ensayo de multiplicación55

2.1.1.1.2. Segundo ensayo de multiplicación.....55

2.1.1.2. Inicio de diferenciación de embriones: optimización de las condiciones
de cultivo para la formación de embriones dipolares.....56

2.1.1.2.1. Primer ensayo de diferenciación: ensayo BAP/TDZ.....57

2.1.1.2.2. Segundo ensayo de diferenciación: efecto del AJ.....58

2.1.1.2.3. Tercer ensayo de inducción de embriones dipolares: Efecto de
otros reguladores.....59

2.1.1.3. Diferenciación de embriones dipolares y formación de plántulas.....59

2.1.1.3.1. Efecto del AJ en la formación del cormo.....60

2.1.1.3.2. Segundo ensayo: efecto combinado AJ/Sacarosa.....61

2.1.1.3.3. Tercer ensayo: efecto del GA₃ en la maduración del cormo.....63

2.1.2. Experimentos en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

2.1.2.1. Descripción del funcionamiento básico de los sistemas.....64

2.1.2.2. Medios para la optimización de la proliferación.....66

2.1.2.3. Generación de material en E1.....66

2.1.2.4. Estadio dipolar

2.1.2.4.1. Inducción de embriones dipolares.....67

2.1.2.4.2. Ensayo con diferentes fuentes de carbono.....67

2.2. Morfología del proceso de embriogénesis somática en azafrán

2.2.1. Caracterización del material vegetal.....67

2.2.2. Microscopía.....70

2.2.2.1. Preparación de las muestras para microscopía óptica.....70

2.2.2.2. Preparación de las muestras para microscopía electrónica de
transmisión.....71

2.2.2.3. Preparación de las muestras para microscopía electrónica de
barrido.....71

2.3. Determinación de actividades antioxidantes en los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán	
2.3.1. Condiciones de crecimiento del material vegetal.....	72
2.3.2. Extracciones enzimáticas.....	73
2.3.3. Determinación de proteínas.....	73
2.3.4. Determinación de actividades antioxidantes	
2.3.4.1. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD).....	74
2.3.4.1.1. Separación de las isoformas SOD en geles.....	74
2.3.4.2. Determinación de la actividad ascorbato peroxidasa.....	75
2.3.4.3. Determinación de la actividad catalasa.....	75
2.3.4.4. Determinación de la actividad monodehidroascorbato reductasa (MDHAR).....	76
2.3.4.5. Determinación de la actividad dehidroascorbato reductasa (DHAR).....	76
2.3.4.6. Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR).....	77
2.3.4.7. Determinación de la peroxidación lipídica (formación de malondialdehído, MDA).....	77
2.4. Niveles de poliaminas en relación con los diferentes estadios de embriogénesis somática en azafrán	
2.4.1. Condiciones de crecimiento del material vegetal.....	78
2.4.2. Preparación de los extractos.....	78
2.4.2.1. Hidrólisis de poliaminas conjugadas solubles.....	78
2.4.2.2. Extracción e hidrólisis de poliaminas conjugadas insolubles.....	79
2.4.2.3. Derivación.....	79
2.4.3. Identificación y cuantificación de poliaminas.....	80
2.5. Ensayos preliminares de manipulación genética en azafrán.....	82
2.5.1. Transformación por biolística.....	85
2.5.1.1. Preparación de las bolas.....	86
2.5.1.2. Unión del plásmido alas partículas.....	87
2.5.2. Transformación mediada por agrobacterium.....	88
2.5.2.1. Transformación de <i>Agrobacterium</i> por electroporación.....	88
2.5.2.2. Transformación de tejidos.....	88
2.5.3. Transformación de protoplastos.....	89
2.5.3.1. Obtención de protoplastos de azafrán.....	89
2.5.3.2. Transformación.....	90
2.6. Análisis estadístico.....	91

CAPÍTULO III: RESULTADOS.

3.1. Desarrollo de un protocolo de embriogénesis somática en azafrán

3.1.0. Obtención de callos embriogénicos.....	92
3.1.1. Experimentos en medio sólido	
3.1.1.1. Multiplicación de embriones: generación de material nodular	
3.1.1.1.1. Primer ensayo de multiplicación sobre callos embriogénicos.....	94
3.1.1.1.2. Segundo ensayo de multiplicación.....	96
3.1.1.2. Inicio de diferenciación de embriones: Formación de embriones dipolares	
3.1.1.2.1. Primer ensayo de diferenciación: Ensayo BAP/TDZ.....	98
3.1.1.2.2. Segundo ensayo de inducción: Efecto del AJ.....	100
3.1.1.2.3. Tercer ensayo de inducción: otros reguladores.....	105
3.1.1.3. Estadio dipolar avanzado y formación de plántulas	
3.1.1.3.1. Primer ensayo: Efecto del AJ en la formación del cormo.....	110
3.1.1.3.2. Segundo ensayo: Efecto combinado AJ/Sacarosa.....	115
3.1.1.3.3. Tercer ensayo: Efecto del GA ₃ en la maduración del cormo.....	121
3.1.2. Experimentos en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)	
3.1.2.1. Medios para la optimización de la proliferación.....	122
3.1.2.2. Generación de material nodular.....	123
3.1.2.3. Inducción de embriones dipolares en sistemas de inmersión temporal.....	125
3.1.2.4. Ensayo con diferentes fuentes de carbono.....	125
3.1.3. Alteraciones del proceso embriogénico encontradas en el cultivo.....	129

3.2. Morfología del proceso de embriogénesis somática en azafrán

3.2.1. Estadío 0: Formación de las masas proembriogénicas.....	131
3.2.2. Estadío 1: Estadío globular.....	133
3.2.3. Estadío 2: Estadío monopolar.....	133
3.2.4. Estadío 3: Estadío dipolar.....	133
3.2.5. Estadío 4: Plántulas.....	133

3.3. Evolución del sistema enzimático antioxidante durante el proceso de embriogénesis somática en azafrán.....

3.3.1. Indicadores de estrés oxidativo.....	136
3.3.2. Actividades antioxidantes.....	136

3.3.3. Isoformas de la actividad SOD.....	141
3.4. Niveles de poliaminas en relación con los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán.....	142
3.4.1. Efecto del tipo de auxina en los niveles de poliaminas.....	142
3.4.2. Niveles de poliaminas totales durante la embriogénesis somática en azafrán.....	143
3.4.3. Poliaminas libres en los cuatro estadios.....	145
3.4.4. Poliaminas conjugadas en los cuatro estadios.....	146
3.4.5. Relaciones de interés en poliaminas.....	147
3.4.6. Efecto de la concentración de ácido jasmónico en la concentración de PAs.....	147
3.5. Primeros ensayos de manipulación genética en azafrán	
3.5.1. Transformación por biolística.....	150
3.5.2. Transformación mediada por agrobacterium.....	156
3.5.2.1. Tejidos infiltrados y sonicados.....	156
3.5.2.2. Infección por heridas e infección de suspensiones.....	157
3.5.3. Transformación de protoplastos.....	160

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1. Desarrollo de un protocolo de embriogénesis somática en azafrán.....	164
4.1.0. La respuesta en inducción de callos embriogénicos estuvo condicionada por la época del año en que se tomaron los explantes.....	166
4.1.1. La multiplicación en medio sólido de los callos embriogénicos se mejoró considerablemente en un medio con ANA y BAP.....	166
4.1.2. El empleo de TDZ no resultó efectivo en el desarrollo de los embriones de azafrán.....	168
4.1.3. El ratio Auxina/Citoquinina resultó fundamental en el desarrollo de los embriones somáticos de azafrán.....	170

4.1.4. El tiosulfato de plata y la putrescina tuvieron un efecto muy positivo tanto el en crecimiento como en la maduración de los embriones.....	171
4.1.5. El ácido jasmónico (AJ) es un compuesto muy efectivo en las últimas etapas de maduración de los embriones somáticos de azafrán.....	174
4.1.6. El grado de madurez de los embriones en el momento de añadir el AJ al medio no parece ser determinante en la respuesta final.....	175
4.1.7. Tratamientos con AJ y posterior incremento de la concentración de sacarosa del medio proporcionó el máximo desarrollo de los embriones hasta plántulas de azafrán.....	176
4.1.8. El ácido giberélico (GA ₃) no resultó efectivo en la maduración de los embriones somáticos de azafrán.....	176
4.1.9. El ajuste de los tiempos de inmersión resultó una alternativa eficaz al empleo de retardantes del crecimiento en sistemas de inmersión temporal.....	177
4.1.10. La fase de multiplicación de los callos embriogénicos se mejoró considerablemente empleando sistemas de inmersión temporal (SIT).....	179
4.1.11. La respuesta de los embriones a las diferentes combinaciones de reguladores en SIT fue similar a la observada en medio sólido.....	179
4.1.12. La fuente de carbono empleada en el cultivo así como la concentración de esta puede ser determinante en el grado de desarrollo de los embriones en SIT.....	180
4.2. Morfología del proceso de embriogénesis somática en azafrán.....	182
4.2.1. Los callos embriogénicos de azafrán mantuvieron una asombrosa capacidad embriogénica durante más de ocho años.....	183
4.2.2. Los embriones proglobulares están formados por masas proembriogénicas periféricas.....	184
4.2.3. El desarrollo de los embriones somáticos de azafrán coincide con las fases de desarrollo descritas en especies afines.....	185
4.2.4. Empleo de reguladores en embriogénesis.....	186
4.3. Evolución del sistema enzimático antioxidante durante el proceso de embriogénesis somática en azafrán.....	188

4.3.1. El nivel de peroxidación lipídica aumento durante el desarrollo de los embriones somáticos.....	188
4.3.2. Los patrones de APX sensible e insensible a PHMB resultaron muy diferentes.....	189
4.3.3. Los niveles de MDHAR fueron muy superiores en todos los estadios a los de DHAR.....	190
4.3.4. La actividad superóxido dismutasa fue máxima en embriones monopolares, E2, mientras que la actividad catalasa fue máxima en embriones bipolares, E3.....	191
4.3.5. La actividad glutatión reductasa se mantuvo constante a lo largo del desarrollo de los embriones somáticos de azafrán.....	193
4.4. Niveles de poliaminas en relación con los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán.....	195
4.4.1. El diferente comportamiento embriogénico de los callos se corresponde con un patrón específico de poliaminas endógenas.....	197
4.4.2. Los niveles de PA conjugadas fueron muy superiores a los de libres durante el proceso de formación de los embriones somáticos.....	198
4.4.3. Putrescina es la poliamina más abundante a lo largo del desarrollo de los embriones somáticos de azafrán.....	199
4.4.4. El establecimiento de la polaridad de los embriones (E2) fue acompañado de un incremento en la conjugación de Put y Dap.....	199
4.4.5. Tratamientos con AJ en E4 provocaron un incremento en los niveles de putrescina tanto libre como conjugada.....	200
4.4.6. Las concentraciones de Put, Spd y Spm tanto libres como conjugadas descritas durante el desarrollo de embriones somáticos de azafrán difieren de las encontradas durante las fases de desarrollo en medio natural.....	201
4.4.7. La relación Put/Spd se plantea como un indicador de la capacidad embriogénica del tejido.....	202
4.5. Primeros ensayos de transformación genética en azafrán.....	205
4.5.1. La transferencia directa de genes se plantea como un sistema adecuado para la transformación de todo tipo de especies vegetales.....	205
4.5.1.1. El vector de transformación y sobretodo el promotor que contiene	

pueden determinar en gran medida el éxito o fracaso de la transformación.....	205
4.5.1.2. La cantidad de ADN y el tamaño y tipo de las micropartículas afectaron a la eficacia de transformación.....	206
4.5.1.3. Los parámetros de bombardeo varían de unas especies a otras.....	207
4.5.1.4. Las características del material vegetal determinan la expresión del ADN introducido y también la expresión endógena del gen de la β -glucuronidasa.....	207
4.5.1.5. En la transformación de protoplastos es fundamental contar con una concentración de protoplastos adecuada.....	208
4.5.2. La transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> es el sistema ideal en transformación estable.....	209
4.5.2.1. Parámetros importantes y estrategias de infección.....	209
4.5.2.2. Selección de transformantes.....	210
RESUMEN Y CONCLUSIONES	212
ANEXOS	
I. Índice de Tablas.....	215
II. Índice de Figuras.....	216
III. Análisis estadísticos.....	222
IV. Datos totales.....	231
BIBLIOGRAFÍA.....	258

Índice de Abreviaturas.

ABA.	Ácido abscísico
APX.	Ascorbato peroxidasa
ASC.	Ácido ascórbico
ACC.	Ácido 1-aminociclopropano1-carboxílico
AIA.	Ácido indol-acético
AIB.	Ácido indol-butírico
AJ.	Ácido jasmónico
ANA.	Ácido naftalenacético
AOS.	Especies de oxígeno activo.
A.T.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AVG.	Aminoetoxivinilglicina
BAP.	Bencilaminopurina
BITC.	Bencilisotiocianato
Cad.	Cadaverina
C.R.D.O.	Consejo Regulador de la Denominación de Origen
CPPU.	N-(2-cloro-4-piridil)-N ¹ -fenilurea
2,4 D.	Ácido 2,4 dicloro fenoxiacético
Dap.	Diaminopropano
DAPI.	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DHA.	Deshidroascorbato
DHAR.	Deshidroascorbato reductasa
D.O.	Densidad óptica
FMOC.	N-9-fluorenilmetilcloroformiato
GA ₃ .	Giberelina 3
GFP.	<i>Green fluorescent protein</i>
GR.	Glutación reductasa
GSH.	Glutación reducido
GSSG.	Glutación oxidado
GUS.	β-glucuronidasa

2iP. Isopentenil adenina
HCAs. Ácidos hidroxicinámicos
Kan. Kanamicina
Kn. Kinetina
MDA. Malondialdehído
MDHA. Monodeshidroascórbato
MDHAR. Monodeshidroascorbato reductasa
MS. Murashige & Skoog
NPA. Ácido naphthitalámico
PAs. Poliaminas
PAC. Paclobutrazol
PAO. Poliamina oxidasa
PEG. Polietilenglicol
PEMs. Masas proembriogénicas
PHMB. Ácido parahidroximercuribenzóico
Put. Putrescina
PVP. Polivinilpirrolidona
ROS. Especies de oxígeno reactivo
SAAT. Sonicación con *Agrobacterium tumefaciens*
SIT. Sistema de inmersión temporal
SLS. Estructuras similares a estigma
SOD. Superóxido dismutasa
Spd. Spermidina
Spm. Spermina
TBA. Alcohol butírico terciario
TCA. Ácido tricloroacético
TDZ. Tiazuron
TIBA. Ácido triiodobenzoico
XOD. Xantina oxidasa
Z. Zeatina



1.-INTRODUCCIÓN

1.1 EL AZAFRÁN (*Crocus sativus* L.)

1.1.1. Características de la planta, ciclo biológico y origen

En el genero *Crocus* encontramos mas de 80 especies (Mathew, 1982) distribuidas por Europa central y meridional y por Asia Menor principalmente. Son plantas herbáceas perennes con un cormo rodeado de varias túnicas protectoras como único órgano permanente. Las raíces están en la base del cormo y a partir de este se generan los cormos hijos. La floración tiene lugar en otoño o en primavera, según la especie, y aparecen siempre flores solitarias. La mayor parte de las especies de este género tienen reproducción sexual además de propagación vegetativa, con semillas globosas o elipsoides y muy abundantes (Figura 1, A1, A2 y A3).

El número cromosómico oscila entre $2n=6$ y $2n=28$ y la mayor parte de las especies parecen originadas por fenómenos de aloploidía, sin embargo en *C. sativus* el proceso ha sido diferente. El azafrán parece responder a un fenómeno de autopoliploidía, con $2n=24$ (Goldblatt y Takei, 1997) originado a partir del genoma de *C. cartwrightianus* ($2n=16$) (Grilli Caiola, 1995). La autotriploidía del azafrán determina su esterilidad, los gametos que se originan en meiosis son desequilibrados (Chichiricco, 1984), a esto se unen fenómenos de incompatibilidad ovárica y mecanismos postzigóticos (Chichiricco, 1996, 1997).

El azafrán es la especie más valiosa, se obtiene tradicionalmente de los estigmas maduros secos escindidos de las flores de *Crocus sativus* L. Es una monocotiledónea de la familia de la iridáceas, rizocárpica con una región aérea de unos 10 a 30cm que procede de la región basal enterrada. La parte aérea aparece en el mes de Octubre y Noviembre originando las flores (Chrungoo y Farooq, 1983, 1985) y se mantiene en forma de hojas hasta el mes de Abril (Plessner y col., 1989), en Mayo se secan las hojas.

La parte basal de la planta es permanente, se trata de un cormo sólido en forma de bulbo, durante los meses de junio, julio y agosto se encuentra en periodo de dormancia (meses de sequía), constituyendo un órgano de supervivencia. El cormo (Figura 1, B1) es el órgano reproductor, mide alrededor de 30mm de diámetro y unos 20-25mm de altura y está compuesto por tejido parenquimático rodeado por varias túnicas de color marrón; en parte superior las túnicas se componen de los restos de hojas del ciclo

anterior. En la base del cormo tras el periodo de dormancia, en el mes de septiembre, se desarrollan las raíces (Figura 1, B1) y se mantienen hasta finales del mes de Mayo cuando comienza de nuevo el periodo de sequía. Encontramos raíces de dos tipos, fibrosas, encargadas de la nutrición del cormo y algunas contráctiles con la función de mantener el cormo enterrado a una profundidad determinada (10-15cm), en el caso de cormos enterrados en profundidades excesivas no hay desarrollo de las raíces contráctiles (Negbi y col., 1989).

Muy poco antes de la floración se desarrollan las hojas, en un numero variable dependiendo del numero de cormos hijos que se originen a partir de cada cormo. Son largas (20-30cm) y estrechas, el limbo tiene nervaduras paralelas y la línea central está muy marcada dando a las hojas de las especies de *Crocus* un aspecto muy particular. Florece a finales de Octubre o principios de Noviembre, las flores (Figura 1, B2), que duran apenas un día, son regulares con tépalos iguales, el segundo verticilo esta compuesto por tres estambres en cuyo espacio intermedio aparecen tres estigmas de color rojo brillante, el ovario es sencillo, ínfero y monocapelar. En la base de cada brote floral se produce un crecimiento, un nuevo cormo, que termina su desarrollo en el mes de Abril del año siguiente, como media se generan tres cormos hijos por cada cormo madre (Chrungoo y Farooq, 1984).

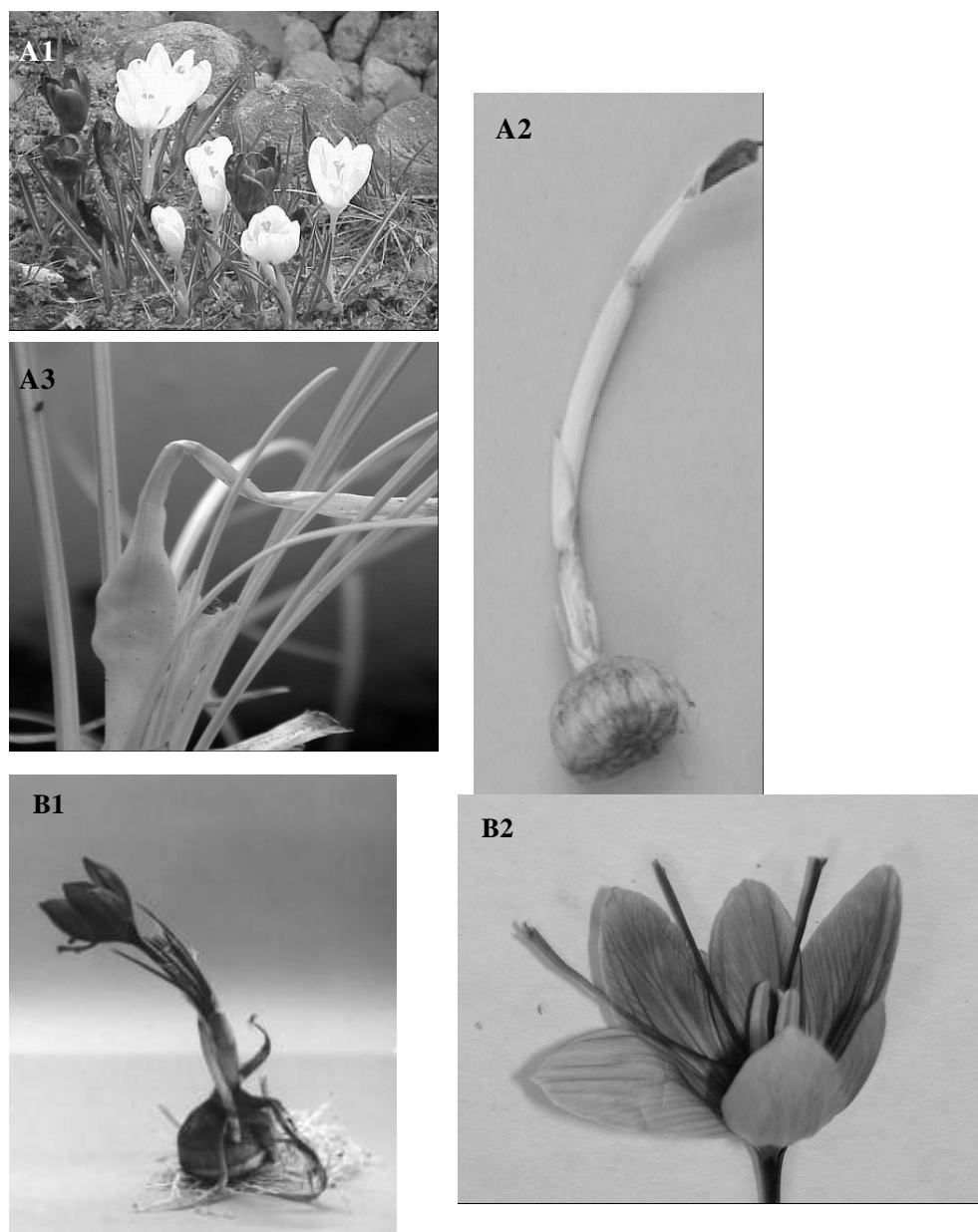


Figura 1. Diferentes variedades de *Crocus vernus* creciendo de forma silvestre, A1. *Crocus cartwrightianus*, cormo con flor, A2, y fruto desarrollado, A3. *Crocus sativus*, cormo con hojas, flor y raíces, B1, y detalle de una flor, B2.

1.1.2. Pasado y presente del cultivo de azafrán en el mundo

El azafrán se conoce únicamente como especie cultivada, remontándose su empleo a las más antiguas civilizaciones. Pese a que se conocen referencias del año 2300 a. C las primeras descripciones del cultivo del azafrán datan del año 1700 a. C; se trata de unos frescos donde se reflejan la recogida y monda. Parece ser que el cultivo se extendió de Oriente a Occidente y fue posiblemente introducido en la Península Ibérica bajo el dominio árabe en el siglo VIII (Alarcón y Sánchez, 1958). El máximo apogeo del comercio del azafrán se produjo durante la Edad Media; en esta época su cultivo se extiende por toda Europa (gracias al gran intercambio cultural durante las Cruzadas).

El azafrán es un cultivo sin muchos requerimientos, soporta elevadas temperaturas en verano y heladas en invierno, crece a diferentes altitudes y con variados niveles de humedad, los suelos deben ser sueltos y con un buen drenaje para facilitar la colonización radicular. El único momento delicado en este cultivo es el periodo de floración, durante el cual es preciso que la humedad no sea excesiva y que no se produzcan heladas. Precisa lluvias en los meses de marzo y septiembre para asegurar el correcto desarrollo del tallo y emergencia posterior de la flor. Por todo esto el cultivo del azafrán ha estado favorecido desde su introducción en la Región Mediterránea y en regiones con climas similares, en el norte de África, España, Francia, Inglaterra, Suiza, Australia, Italia, Grecia, Turquía, Azerbaijón, Irán, India y China. Actualmente pese a que sigue siendo una especia muy apreciada en todo el mundo el cultivo se esta perdiendo progresivamente muchos de estos países, entre ellos España.

El principal productor de azafrán en el mundo es Irán, con el 83% de la producción mundial (datos del Ministerio de Agricultura iraní, 1999), de esta producción mas de la mitad se exporta a países como España y los Emiratos Árabes Unidos. Grecia es la segunda productora mundial con una producción unas 14 veces inferior a la de Irán. España produce menos de la mitad de azafrán que Grecia. Marruecos y la India tienen la mitad de producción que España. Italia mantiene una producción casi simbólica de 100Kg. En el resto de los países el cultivo del azafrán se ha perdido casi totalmente en las últimas décadas.

Mientras que en países como Irán la producción de azafrán aumenta año tras año gracias a las políticas de gobierno y fundamentalmente a una mano de obra más barata, en los países europeos está en franco retroceso por las razones opuestas. Se mantienen en

regiones muy concretas como los Abruzzos en Italia, Quercy en Francia y la localidad de Mund en Suiza donde el cultivo se preserva únicamente por connotaciones culturales y tradicionales. En Grecia y España la producción de azafrán esta respaldada por una Denominación de Origen Protegida de la Unión Europea, que ha servido en el caso de Grecia para recuperar las regiones de cultivo (en Macedonia) y convertir a este país en el segundo productor mundial. El cultivo de azafrán en España ha mantenido el retroceso observado en toda Europa pese a la Denominación de origen del Azafrán Mancha del 7 de marzo de 2001 (1) (Reglamento CE-464/2001).

Aunque la única especie dentro del género *Crocus* de la que se obtiene tradicionalmente la especia del azafrán es *C. sativus*, se conoce una región en Italia (Comunidad Montana, “Vallo di Diano” en Salerno) donde una especie relacionada *C. longiflorus* se emplea tradicionalmente como aditivo culinario. Estudios de las características de los estigmas de esta especie muestran muchas similitudes, tiene un elevado poder colorante aunque es mucho menos aromática (Casoria y col., 1996).

1.1.3. Cultivo de azafrán en España y Castilla la Mancha

Tradicionalmente el cultivo del azafrán en España ha sido muy importante. Hasta principios del pasado siglo era centro del mercado mundial con producciones equivalentes a las que encontramos hoy en día en Irán. Se cultivaba principalmente en Albacete, Teruel y Cuenca, en menor medida en Toledo, Ciudad Real, Zaragoza, Murcia y Valencia y regionalmente en zonas de Andalucía, Castellón, Tarragona e Islas Baleares. La producción y el área dedicada al cultivo fueron disminuyendo a lo largo de este siglo debido fundamentalmente a la falta de modernización del cultivo, el abandono de las zonas rurales y la creciente competencia con la producción de los países asiáticos. A mediados del siglo XX la producción se había reducido a la mitad y dividido por tres la superficie dedicada a este cultivo, en la segunda mitad (de 1960 a 1986) el área de cultivo se mantuvo, no así la producción que pasó de 42tm en 1964 a 29tm en 1986. Datos de la Estadística Nacional Agraria de 1998 reflejan una reducción de la superficie de cultivo a menos de 1000 ha (cuatro veces menor que la referida en 1986) y una producción de apenas 7tm (Figura 2).

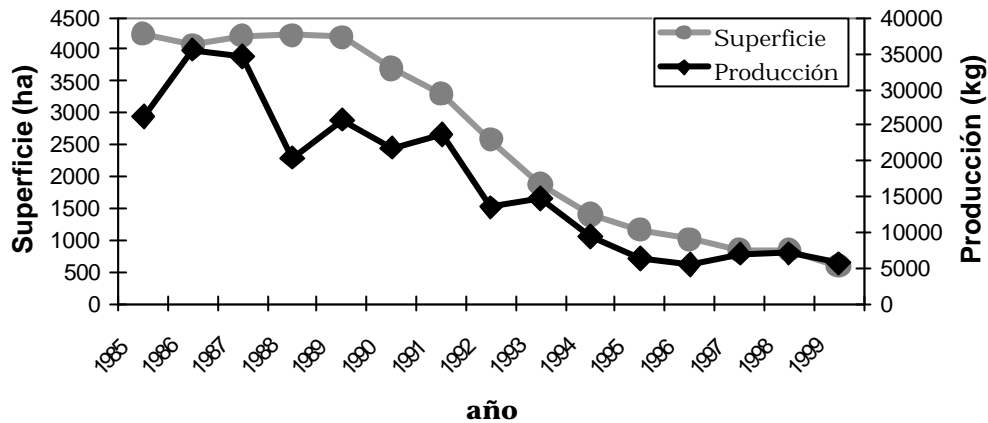


Figura 2. Evolución en España desde 1985 a 1999 de la superficie dedicada al cultivo de azafrán y de la producción de estigma tostado. Fuente: Anuario M.A.P.A.

Pese a todo esto España sigue teniendo el práctico monopolio del comercio del azafrán gracias a la importación y distribución de azafrán de origen iraní.

En Castilla La Mancha existe constancia escrita del cultivo del azafrán desde 1720. En el libro “Cultivo del azafrán en la Solana” de 1897 se hace referencia a un documento de 1720 donde se menciona también el cultivo del azafrán. Durante el primer tercio del siglo XIX se producía en esta comunidad el mejor azafrán de España lográndose además los mayores rendimientos por hectárea de secano. Actualmente esta región sigue siendo la principal productora, el 90% del azafrán español se produce en cuatro provincias de Castilla la Mancha, Albacete, Ciudad Real, Cuenca y Toledo, provincias incluidas en su totalidad o en parte en la D.O. de Azafrán de la Mancha.

El acusado descenso en la producción y en la superficie de cultivo de azafrán observado en todo Europa ha afectado también a esta región, la disminución ha sido más acusada en la última década (más de un 90% en superficie cultivada y un 85% en producción) en todas las provincias a excepción de Toledo donde existe un ligero incremento en superficie cultivada y en producción de azafrán en los últimos años. La provincia más castigada con la pérdida paulatina del cultivo del azafrán en la región ha sido Albacete (principal productora hasta hace unos años) donde se han perdido casi totalmente las más de 12tm de producción registradas en 1991.

Tras la concesión de la Denominación de Origen Protegida al Azafrán de la Mancha se creó la Fundación “C.R.D.O. Azafrán de la Mancha” (Consejo Regulador de la Denominación de Origen) con sede en la localidad de Camuñas en Toledo. Este organismo se encarga de garantizar que el azafrán amparado por la denominación de origen se ha producido dentro de su zona geográfica de acuerdo con los requisitos establecidos en un pliego de condiciones (inscrito en el Registro Comunitario de Denominaciones de Origen Protegidas). El C.R.D.O. respaldado por la concesión de la categoría especial para el azafrán de la Mancha puede ser la esperanza de recuperación del cultivo en Castilla la Mancha.

1.1.4. Problemas del cultivo en España

La drástica disminución de la superficie de cultivo dedicada al azafrán en nuestro país es consecuencia del sucesivo abandono de los campos de azafrán en todas las regiones con tradición en este cultivo, abandono motivado por la escasa rentabilidad del cultivo del azafrán en las condiciones actuales, tanto de cultivo como de mercado. Pese a que se trata de la especia más cara del mundo no es rentable para el agricultor en la actualidad dedicar su terreno al cultivo del azafrán, esta paradoja se explica por una serie de factores:

- Falta de mecanización. El cultivo, recogida y procesamiento del azafrán se realizan de forma artesanal, no ha habido apenas cambios en el procedimiento desde hace siglos (Figura 3, A). Las características de la floración y de la propia flor hacen muy compleja la mecanización de la recogida y del desbrizado, aunque actualmente se investiga en este campo con el objetivo de idear un sistema de recogida que precise menor intervención del hombre. El hecho de que todo el proceso sea artesanal convierte al azafrán en uno de los pocos cultivos en los que es necesaria la mano de obra en todos los pasos del procesamiento y por tanto muy poco atractivo desde un punto de vista empresarial.
- Falta de mano de obra. Consecuencia del punto anterior es la necesidad de mano de obra abundante, sobretudo para la recogida y el desbrizado, la emigración constante de las zonas rurales a las ciudades desde hace mas de 50 años ha provocado un descenso en la población rural y por tanto en la mano de obra disponible.

- Desaparición de un estilo de vida tradicional. La emigración de los pueblos a las ciudades provoca necesariamente un cambio en el estilo de vida, ya no puede mantenerse un cultivo en pequeñas superficies como ayuda extra a la economía familiar, sino que priman las grandes explotaciones con elevados rendimientos.

Actualmente los pequeños agricultores que mantienen este tipo de explotación tradicional lo hacen para uso personal y en ningún caso como medio de vida ni como fuente de ingresos.

Otro de los factores que han influido en la pérdida del cultivo ha sido la falta de material vegetal de calidad. El azafrán presenta la desventaja de no poder ser mejorado genéticamente, ya que se trata de una planta estéril. Otra consecuencia de su esterilidad es la falta de variabilidad genética que hace que la selección que realiza el agricultor antes de la siembra se vea muy limitada. En este campo es interesante la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* para la obtención de cormos de calidad e incluso mejorados genéticamente por técnicas de transformación genética.

Por último, uno de los grandes problemas del azafrán es que debido al precio tan elevado que alcanza en el mercado es muy susceptible de sufrir adulteraciones. Existen muchas especies que producen material biológico de aspecto similar al azafrán (*Cannabis* sp, *Carthamus tinctorius*, *Calendula officinalis*, *Árnica montana*, *Lythrum salicaria*) que se han empleado desde las primeras épocas de comercio de este especia para mezclar sus estigmas con los estigmas de azafrán (Figura 3, B y C). Ya en la Edad Media se conocían inspectores encargados de evitar la adulteración del azafrán. En la actualidad el organismo encargado de controlar esta adulteración es el C.R.D.O por medio de un sello de calidad distingue la producción que cumple la normativa establecida (Figura 3, D).

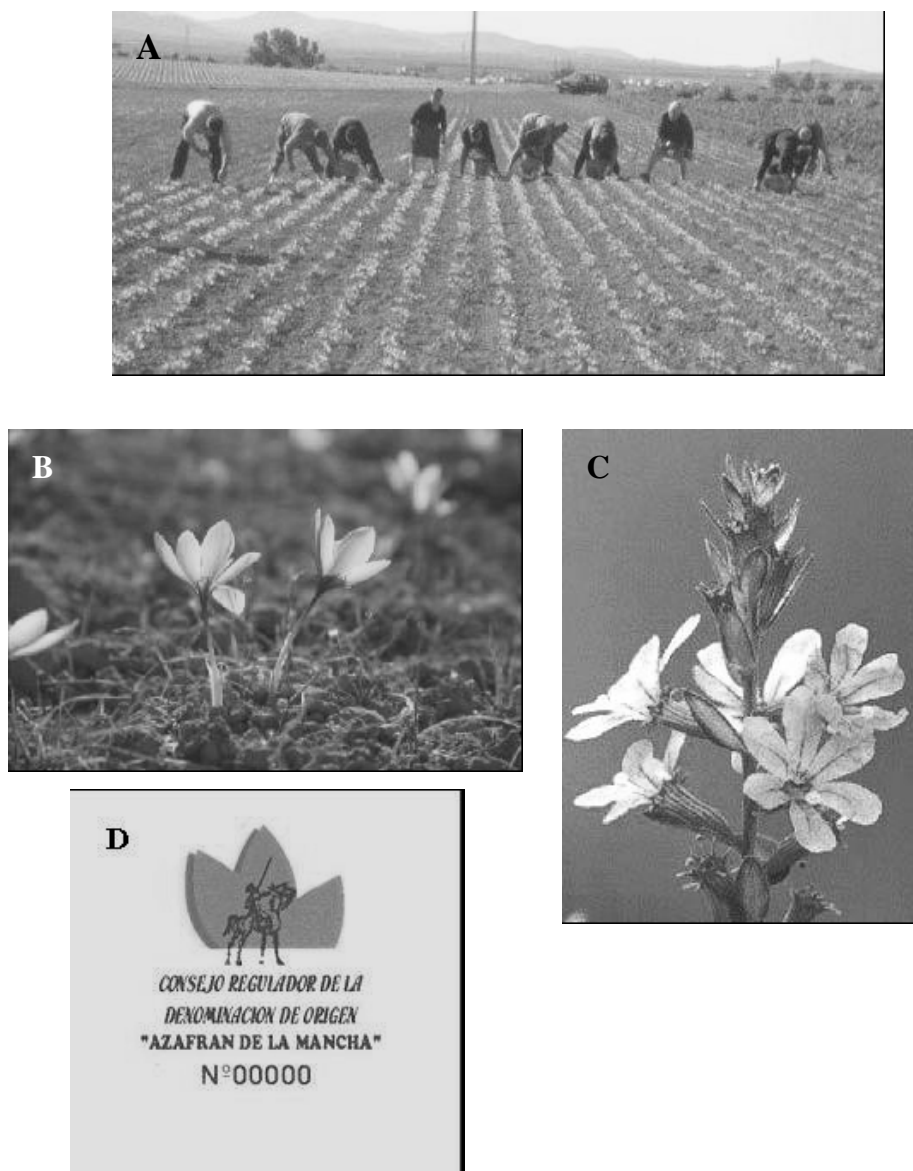


Figura 3. Labores de recogida del azafrán en el campo, A, se aprecia la dificultad del proceso manual. Flores de *C. sativus*, B, y de *Lythrum salicaria*, C, la similitud llega al punto de tener que detectar la adulteración por análisis minucioso, hebra por hebra. Sello de calidad que el consejo regulador pone a toda la producción que cumple la normativa establecida para el azafrán de la Mancha, D.

1.1.5. Cultura del azafrán

Todo lo que rodea al cultivo del azafrán y a los momentos de recogida, desbrizado, tueste y venta de esta especia está íntimamente relacionado con la vida en muchos pueblos españoles y otras regiones del mundo. El hecho de que se trate de uno de los cultivos conocidos más antiguos hace que esté presente en manifestaciones de todo tipo y que se pueda hablar incluso de un estilo de vida en torno al cultivo del azafrán.

En España se mantienen algunos vestigios de esta cultura del azafrán. En una de las regiones de importancia hace años como es Teruel existe un museo al azafrán (Figura 4) (situado en Monreal del Campo). Este museo pone de manifiesto que la forma de vida del pueblo durante la “época de la rosa” cambiaba totalmente y giraba en torno a la especia. Actualmente incluso se celebra un concurso durante el último domingo de Octubre o el primero de Noviembre en el que se premia la rapidez y habilidad en el desbrido de la flor de azafrán. Al igual que en Monreal del Campo en muchos pueblos manchegos los meses de Octubre y Noviembre eran los meses de la rosa, durante estos meses todo el pueblo tenía una única ocupación, recogida y desbrizado del azafrán.

En Castilla la Mancha se conservan muchas de las manifestaciones culturales relacionadas con el azafrán, existe una Jota Manchega dedicada al azafrán, aparece en canciones populares, en refranes e incluso hay una zarzuela con su nombre (“La Rosa del Azafrán” Libreto de F. Romero y G. Fernández Show; y música del maestro Jacinto Guerrero, estrenada en Madrid en 1930). Como toda actividad fuertemente enraizada en una sociedad, el cultivo del azafrán ha dado lugar a un vocabulario propio de gran riqueza. El trabajo de M. Nuñez y J.C. Conde, "El léxico del azafrán en el habla manchega" (Al-Basit. Revista de Estudios Albacetenses, 28. Albacete 1991) incluye una amplia muestra de expresiones referidas al azafrán recogidas mediante encuestas realizadas en la provincia de Albacete. Cabe destacar también la existencia de manuales de divulgación de las técnicas de cultivo y elaboración, como, de J.A. López de la Ossa, o la obra de L. Jiménez Martín "El azafranero práctico" (Albacete: Imprenta Eduardo Miranda, 1900). Existe incluso una Fiesta de la Rosa del Azafrán que se realiza en Consuegra (Toledo), concursos de monda que se celebran en La Solana (Ciudad Real) durante las fiestas patronales y el Festival de la Rosa del Azafrán de Santa Ana (Albacete).

Otra muestra significativa del carácter tradicional y de la importancia económica de este cultivo en Castilla La Mancha es la costumbre, que se mantiene desde antaño en algunos pueblos manchegos, de regalar unas briznas de azafrán a las parejas de novios como símbolo del deseo de prosperidad.



Figura 4 Representación de una familia durante el desbrizado del azafrán en una cocina antigua. Fotografía del museo del Azafrán en Monreal del Campo (Teruel).

1.1.6. Usos

Los usos del azafrán a lo largo de la historia han sido diversos, romanos y griegos lo empleaban como perfume y en el mediterráneo y oriente medio se usó como tinte. Por lo general se empleaba y se sigue empleando como aditivo culinario dadas sus características organolépticas (color, sabor y aromas muy peculiares) y desde la edad media hasta hace unas décadas se conocía como un remedio medicinal muy eficaz estando presente en medicinas tradicionales de diversas culturas.

El uso que daban romanos y griegos al azafrán como perfume se ha mantenido hasta nuestros días, en la actualidad se emplea como componente en la preparación de perfumes y cremas bronceadoras, incluso en la industria alimentaria donde sirve para preparar comidas deshidratadas, sopas etc. Se le han atribuido también propiedades afrodisíacas y es usado ampliamente con este fin en gran parte de Asia y Oriente Medio. En las últimas décadas se ha retomado el interés por las propiedades medicinales del azafrán, tanto el estigma seco que compone la especia como diversas partes de la planta como puede ser el cormo. Se demostró la influencia de la crocetina en la disminución de la arteriosclerosis mediante la reducción de los niveles de colesterol (Gainer y Chisholm, 1974) y su efecto anticancerígeno por disminución de la toxicidad del benzo(a)pireno

(Chang y col., 1996) inhibiendo la protein kinasa C (Wang y col., 1996) o por su elevado poder antioxidante (Tubaro y col., 1996, 1998). Otros derivados como la crocina tienen un efecto directo sobre el comportamiento de ratones en laboratorio, sobre el sistema nervioso (Sugiura y col., 1995, 1996; Abe y col., 1998). Crocina, crocetina, picrocrocina y safranal tienen un efecto selectivo inhibidor sobre el crecimiento de células tumorales *in vitro* (Abdullaev, 1993; Escribano y col., 1996; Abdullaev y De Mejia 1997). Además de estos compuestos un glicoconjugado presente en el cormo de azafrán (Escribano y col., 1999a, 2000a) tiene también el mencionado efecto selectivo inhibidor del crecimiento de células cancerígenas *in vitro* (Escribano y col., 1999b, 2000b). Esta molécula se ha encontrado también en callos de cormo de azafrán (Escribano y col., 1999c).

1.1.7. Mejora clásica en azafrán

El azafrán es, como se menciona anteriormente, una planta triploide y por tanto estéril. En este tipo de plantas las estrategias de mejora clásica no son aplicables. La mejora en una planta como el azafrán se ha basado históricamente en la selección de los cormos de mayor tamaño y con mejor aspecto, más sanos, como cormos madre empleados en el establecimiento de líneas. Los mecanismos tradicionales de mejora basados en el cruzamiento de parentales para obtener F1 con caracteres de ambos, uso del vigor híbrido y semillas híbridas, variedades sintéticas etc., no son aplicables a plantas de reproducción vegetativa.

Hasta el momento la mejora en azafrán ha consistido en seleccionar cormos en función de los caracteres aparentemente más heredables y emplearlos como productores de cormos hijos. En este punto puede resultar muy útil el empleo de la micropropagación de cormos de azafrán, como mecanismo para producir gran cantidad de cormos a partir de unos pocos cormos selectos. Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten obtener gran cantidad de material vegetal con el empleo de poco espacio y tiempo (George, 1996) y pueden suponer una solución a los problemas de cultivo del azafrán en nuestro país.

1.2. MICROPROPAGACIÓN

Se define como la propagación clonal de plantas mediante cultivo de tejidos (explantes) en medios de cultivo de composición definida, condiciones ambientales estériles y controladas (George, 1993).

1.2.1. Introducción

El cultivo de tejidos es el crecimiento o proliferación en condiciones artificiales y de esterilidad de cualquier parte de una planta correspondiente a cualquier nivel de organización. Este tipo de cultivo permite la micropropagación, totalmente asexual, de una planta madre (donadora) y garantiza la perpetuación de las características en toda la línea originada a partir de esta; se trata de una multiplicación clonal.

La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en plantas es posible gracias a la totipotencia celular de la célula vegetal (Schwann, 1839). Así, cualquier célula de un organismo vegetal es autosuficiente y capaz de regenerar un individuo completo siempre que se le proporcionen las condiciones externas adecuadas, dado que contiene toda la información necesaria para el desarrollo del mismo.

En 1939 se logra cultivar los primeros callos (masas de células vegetales con crecimiento indefinido de tipo tumoral) (Gautheret, 1939; Nobecorut, 1939; White, 1939) en este punto comienza el desarrollo de la micropropagación.

1.2.2. Etapas en micropropagación

En 1974 Murashige diferenció tres etapas en el proceso de micropropagación (etapa I, establecimiento del cultivo aséptico, etapa II, proliferación y etapa III, preparación para el crecimiento en un medio natural). Estas tres etapas fueron ampliadas posteriormente a 5, con una etapa 0 de tratamiento y preparación de la planta madre (Debergh y Maene, 1981) y una etapa IV de aclimatación de las plantas al medio externo (George, 1996). En la Figura 5 se presenta el esquema básico de micropropagación en bulbosas.

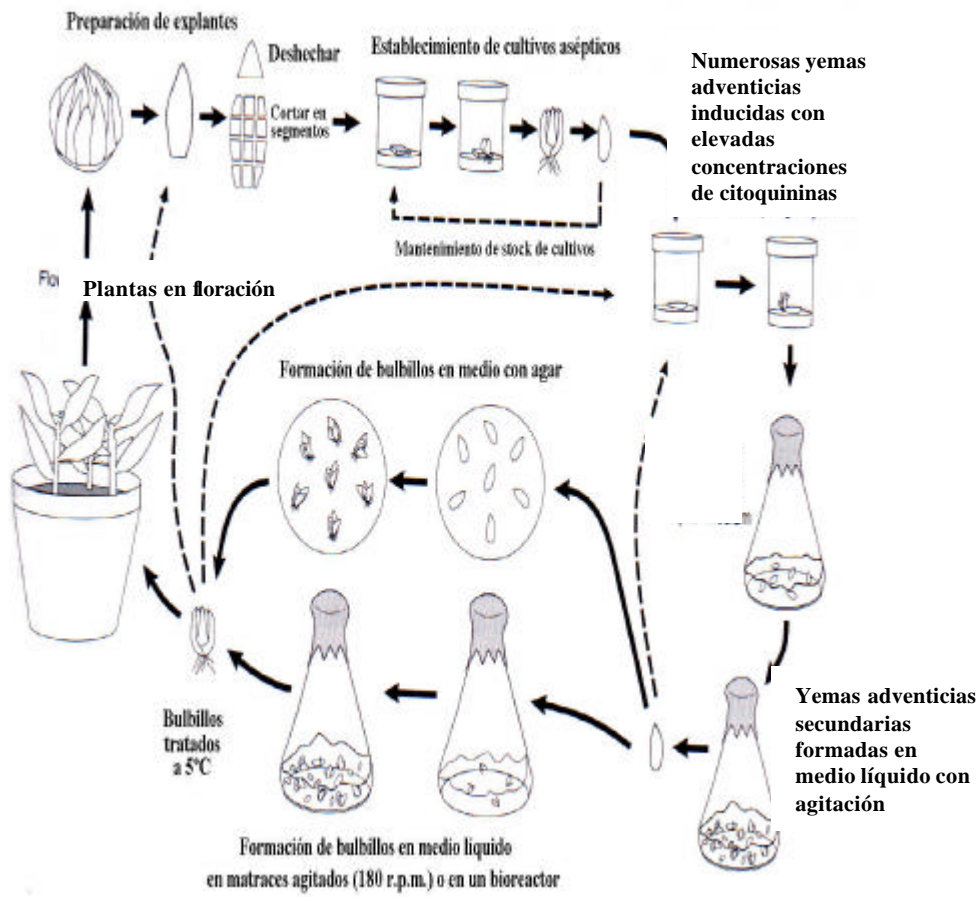


Figura 5. Esquema básico de micropropagación en una bulbosa

En la etapa 0 hay una preparación de la planta madre y una selección de ciertas regiones dentro de ésta. Debe tratarse de una planta saludable y vigorosa que se haya mantenido en crecimiento activo sin estrés. Además, por lo general, los cultivos se establecen más fácilmente a partir explantes recogidos de plantas en el inicio del desarrollo o con crecimiento activo, y de regiones de la planta donadora con mayor tasa de crecimiento, (Pierik, 1969; Pierik y Steegmans, 1975; Takayama y Misawa, 1982; Fasolo y col; 1988).

La época del año en la que se selecciona la planta y la parte de ésta elegida para establecer el cultivo son también factores importantes en muchas especies, ya que determinan diferencias importantes en las tasas de contaminación tanto superficial como endógena (Enjalric y col., 1988). Por ejemplo en órganos subterráneos hay un mayor contacto con los contaminantes y la esterilización es más compleja (Hussey, 1975a, b).

En otros casos la morfología del explante puede dificultar su esterilización (Górecka, 1987). Dependiendo de la parte de la planta empleada como explante los tipos celulares serán diferentes (y por tanto el grado y tipo de diferenciación) y también el nivel hormonal endógeno, gradientes y transporte de dichas hormonas (Burguer y col. 1986), estos factores pueden condicionar la respuesta.

En el género *Crocus* y otras plantas relacionadas se han empleado como explantes diferentes tejidos, algunas de las referencias se relatan en la Tabla 1.

Especie	Explante	Referencia
<i>Hymenocallis littoralis</i>	Fragmentos de bulbo	Backhaus y col., 1992
<i>Narcissus papiraceus</i>	Brotes axilares	Bergoñón y col., 1992
<i>Tulipa gesneriana</i>	Segmentos de tallo	Le Nard y Chanteloube, 1992
<i>Lilium rubellum</i>	Segmentos de hoja	Niimi y Onazawa, 1979 Niimi, 1984
<i>Lilium speciosum</i>	Secciones de pétalo	Takayama y Misawa, 1979
<i>Nerine "Mansellii"</i>	Pedicelos florales	Lilien-Kipnis y col., 1992
<i>C. chrysanthus</i>	Segmentos de hojas, pétalos, anteras, ovarios y cormo	Fakhrai y Evans. 1989
<i>C. sativus</i>	Fragmentos de cormo	Homes y col., 1987 Piqueras y col., 1999
<i>C. sativus</i>	Fragmentos de ovario inmaduro	Loskutov y col., 1999
<i>C. sativus</i>	Estigmas	Konosuke e Himeno, 1987 Sarma y col., 1990

Tabla 1. Explantes empleados en el cultivo de plantas con bulbos y cormos.

La etapa I consiste en la obtención de un cultivo aséptico a partir del material vegetal seleccionado. El material se desinfecta y se introduce en el medio de cultivo apropiado para su desarrollo. El medio de cultivo empleado generalmente en plantas productoras de bulbos y cormos es el MS (Murashige y Skoog, 1962) en *Gladiolus* (Lilien-Kipnis y col., 1987), para producción de embriones somáticos en *Freesia* (Bach, 1992), aunque en ocasiones se han empleado medios especiales como el Ringe y Nitsch (1968) (MS modificado, sales del medio MS con FeEDTA) en cultivo de brotes del género *Freesia* (George, 1993). Un factor importante en esta etapa es la polaridad del explante al colocarlo en el medio de cultivo; en función de la orientación del explante (partes proximal y distal) la respuesta puede ser muy diferente. La orientación condiciona los niveles hormonales endógenos y su transporte a través del explante.

La etapa II consiste en la proliferación y multiplicación en el medio de cultivo. Durante esta fase del cultivo son fundamentales los reguladores hormonales aplicados en el medio de cultivo, generalmente se emplean auxinas y citoquininas (ver más adelante) combinadas en diferentes proporciones en función del tipo de planta, explante etc. La relación auxinas/citoquininas alcanzada finalmente por el explante (considerando tanto los aportes exógenos como los niveles endógenos) determina la respuesta final. Podemos encontrar dos tipos básicos de respuesta:

-Proliferación de una célula o grupo de células diferenciadas que originan mediante su desarrollo un órgano: Organogénesis Directa. Homes y col., 1987 fueron los primeros en describir este proceso en azafrán, formación directa de brotes sobre la superficie de corte de bulbos. También en 1987 Konosuke Sano y col. obtuvieron estructuras similares a estigmas (SLS) por cultivo de medios ovarios de azafrán. Generalmente se requiere el paso previo por la fase de callo. El desarrollo puede originar un embrión, embrión somático, que se desarrolla hasta llegar a ser una planta completa (embriogénesis somática directa). Este proceso es muy poco frecuente y aparece normalmente en el cultivo de tejidos asociados con la formación de gametos, aunque Bach en 1992 obtuvo directamente embriones somáticos a partir del cultivo de meristemas en *Freesia*.

-Desdiferenciación celular acompañado de un crecimiento de tipo tumoral, originando masas celulares indiferenciadas denominadas callos. Estos callos pueden seguir dos vías, un desarrollo de órganos a partir de estos callos, Organogénesis Indirecta, o formación de embriones somáticos, Embriogénesis Somática Indirecta. La

organogénesis indirecta en azafrán se ha estudiado en cormos (órgano que funciona como semilla) (Isa y Osawara, 1988, Piqueras y col, 1999), pero lo más estudiado ha sido la regeneración de estigmas dado que es la parte más valiosa de la planta, (Konosuke Sano y col., 1987; Fakhry y col., 1990; Sarma y col., 1990; Loskutov y col., 1999).

La etapa III es de enraizamiento y elongación. Estos procesos pueden tener lugar en el mismo medio de la etapa II o en un medio menos concentrado o una dilución del medio de la etapa II (Hammerschlag y col., 1987; Serres y col., 1990; Wang, 1992) aunque en otros casos un pretratamiento con medio más concentrado favorece la formación de raíces (Martinelli, 1985). La elongación puede inducirse por un incremento de la concentración de citoquininas respecto a la de auxinas en el medio de cultivo o con el empleo de compuestos específicos en función de las características de cada especie.

En la etapa IV o de aclimatación las plántulas regeneradas en las anteriores etapas deben adaptarse a las condiciones ambientales *ex vitro*. Durante el proceso de cultivo *in vitro*, las plantas sufren alteraciones fenotípicas consecuencia de la peculiar ecofisiología de los contenedores *in vitro*, caracterizada por humedad relativa a saturación, baja intensidad luminosa, elevada concentración de nutrientes en el medio de cultivo, presencia de carbohidratos y reducido intercambio gaseoso con la atmósfera exterior. En estas condiciones las plántulas regeneradas tienen un deficiente control de sus relaciones hídricas y menor protección frente a pérdidas de agua por transpiración (Druart, 1992).

1.2.3. Alternativas en morfogénesis in vitro

En la organogénesis directa existen diversas formas de cultivo en función de la parte de la planta empleada como explante:

- Cultivo de brotes axilares
- Cultivo de meristemos
- Cultivo de protoplastos

a) Cultivo de brotes axilares

Generalmente la introducción de material vegetal *in vitro* se ha realizado a partir de brotes del extremo apical del tallo. Los nuevos brotes desarrollados a partir de yemas

axilares sirven como explantes para repetidas proliferaciones. Estos brotes pueden proceder de material en crecimiento activo (Harada y col., 1996) o de material en reposo (Shibli y col., 1997). En este último caso los brotes deben haber cubierto las necesidades de frío antes de ser introducidos *in vitro*. El medio de introducción y establecimiento del material puede ser el mismo que se usa en proliferación o no (Rajashekar y col., 1995) y la combinación de reguladores empleada varía en función de la especie en cultivo, puede usarse medio base sin reguladores (Poincha, 1991) o niveles mínimos de citoquininas como ocurre en el cultivo de brotes de melocotonero (Martinelli, 1985). En estudios en azafrán Ahuja y col. (1994) iniciaron el cultivo de embriones somáticos de azafrán a partir de brotes meristemáticos pero pasando por la fase de callo.

b) Cultivo de meristemas

Los primeros experimentos en cultivo de meristemas se realizaron con el objeto de eliminar virus en plantas por medio del cultivo de regiones de crecimiento muy rápido como son las zonas meristemáticas (Morel y Martín, 1952, 1955), así se logró propagar varios tipos de orquídeas (Morel, 1960, 1964). La introducción del material vegetal se realiza generalmente utilizando el tronco meristemático con los dos o tres primeros primordios florales. El tamaño de meristemo introducido en el medio de cultivo es variable, se debe llegar a un equilibrio entre un tamaño suficientemente grande para asegurar una regeneración efectiva y pequeño para asegurar la ausencia de contaminantes. Los tamaños varían dependiendo de la especie, generalmente entre 0,2 y 1mm (Boxus y Quoirin, 1974; Broome y Zimmerman, 1984; Goldfarb y col., 1996). Con respecto a la combinación de reguladores de crecimiento el BAP (6-benzilaminopurina) es indispensable para el desarrollo y crecimiento de los meristemas (Carré y col., 1978; Vinterhalter y Neskovic, 1992) y el GA₃ (ácido giberélico) puede favorecer su elongación (Carré y col., 1978). En plantas con reproducción por medio de bulbos y cormos se han realizado estudios de este tipo en *Narcissus* (Hollings, 1965; Stone, 1973), *Gladiolus* (Sutton, 1978), *Lilium* (Simpkins y col., 1981) y *Freesia* (Brants, 1968). En azafrán Sano y col. en 1987 cultivaron tejidos meristemáticos procedentes de ovarios de azafrán en medio base LS (Linsmair, 1965) suplementado con N₆ (Nitsch, 1972) obteniendo estructuras similares a estigmas (SLS) por medio de organogénesis tanto directa como indirecta.

c) Cultivo de protoplastos

Los protoplastos son células vegetales sin pared celular. Se obtienen por digestión enzimática de la pared con una mezcla de diferentes enzimas hidrolíticas de la pared celular vegetal, aunque los primeros protoplastos los obtuvo Kiercker en 1982 por métodos quirúrgicos complejos. Las células sin pared son capaces de regenerar su pared celular en las condiciones de cultivo adecuadas, originar células completas y posteriormente tejidos. Debido a la ausencia de pared celular el intercambio de estas células con el medio es mucho mayor que en células vegetales normales, lo que convierte a los protoplastos en una herramienta fundamental para el estudio de procesos de transporte y división celular, morfogénesis, mutagénesis, selección, etc. La aplicación más utilizada actualmente es la transformación genética por hibridación o fusión somática, por introducción-absorción de proteínas, ADN (vegetal, vírico o bacteriano), macromoléculas, etc.

Los protoplastos pueden aislarse de muy diversas partes de la planta, cultivadas tanto *in vitro* como *ex vitro*. Pueden obtenerse protoplastos de tejidos de callo (Oliveira y col., 1991), ápices de raíz, ápices de tallo, frutos, nódulos de raíces, coleóptilos, láminas de aleurona de cereales, microsporas e incluso de tubos polínicos, pero en la actualidad la fuente de protoplastos más habitual es el tejido de mesófilo de las hojas jóvenes (Montagno y col., 1991; Sarangi y col., 1992). La regeneración de plantas completas a partir de estos protoplastos aislados se ha logrado en numerosas especies (Damm y Willmitzer, 1988). En algunas especies el cultivo de protoplastos se realiza en cápsulas de alginato que permiten un mejor desarrollo de éstos (Schanabl y col., 1983; Kageyama y col., 1995). En azafrán Isa y col. (1990) lograron la regeneración de plantas completas a partir de protoplastos cultivados de esta forma.

1.2.4. Alternativas al cultivo en medio sólido: Cultivos en medio líquido

El agar es el polímero empleado generalmente en la gelificación de los medios de cultivo, aunque en cultivos particulares se usan otros como gelitre, con mejores resultados que el agar en plantas herbáceas, (George, 1993); agarosa, para regeneración de protoplastos (Lörz y col., 1983) y cultivo de anteras, (Chaleff y Stolarz, 1981); o almidón en el cultivo de anteras de cebada (Sorvari, 1986).

Las características del agar vienen determinadas por el grado de pureza y por la concentración con la que se emplea en el medio de cultivo que por lo general oscila

entre 0,7 y 1%, aunque en ciertas circunstancias, dependiendo sobretodo de la pureza del agar y del pH del medio, las concentraciones oscilan en torno a 0,4-0,5%. El nivel de agar en el medio de cultivo debe ser adecuado puesto que implica fenómenos hídricos, puede provocar hiperhidratación (Debergh y col., 1981), e incluso afectar a la regulación de la morfogénesis (Linsmaier y Skoog, 1965).

En *Crocus* generalmente se emplea agar (Homes y col., 1987; Isa y Osawara, 1988, Fakhray y Evans, 1989) aunque en cultivo de estigmas también se ha usado Gelitrite (Koyama y col., 1987).

Pese a que la mayor parte de los ensayos en micropropagación se han realizado tradicionalmente en medio sólido los cultivos en medio líquido y semilíquido presentan ventajas importantes en muchas especies (Figura 6).

El cultivo en medio líquido es un sistema general para crecimiento rápido y multiplicación de plantas *in vitro*. Se requiere menor manipulación que en medio sólido y facilita el escalado en los sistemas de cultivo (Ziv, 1992b). Es necesario para el cultivo de suspensiones celulares, de protoplastos y órganos de pequeño tamaño como anteras. Se emplea en cultivo de estigmas de azafrán (González, 1998), donde también se han usado medios semilíquidos (Sarma y col., 1990). Es importante en estos medios la agitación, para evitar la formación de agregados celulares, airear los cultivos, reducir los efectos de polaridad del explante, distribuir uniformemente los nutrientes y diluir los posibles compuestos tóxicos exudados por los explantes. Tiene una serie de ventajas con respecto al medio sólido, se evitan los gradientes, la totalidad del explante está en contacto con el medio y la disponibilidad de los nutrientes es mayor. Todo esto se traduce en unas tasas de multiplicación mayores y una mejor respuesta, por ejemplo en cultivo de brotes de manzana, (Snir y Erez, 1980), en cultivo de cormos de broadiacea (Ilan y col., 1995) y, especialmente, en embriogénesis somática (Aitken-Christie, 1995). Sin embargo en otras especies el cultivo en medio líquido es desfavorable. En maíz por ejemplo las suspensiones celulares producen mucílagos que interfieren en el crecimiento, lo mismo ocurre en cultivo de callos embriogénicos de *Phragmites australis* (Straub y col., 1988). En muchos casos las primeras etapas del cultivo se realizan en medio sólido y posteriormente se usan los sistemas líquidos, por ejemplo en embriogénesis somática en azafrán, Ahuja y col en 1993 realizaron la inducción de embriones es en medio sólido y la multiplicación en medio líquido.

Un serio problema relacionado con el empleo de medios líquidos en micropropagación es la hiperhidratación debida a que los explantes están sumergidos en el medio de cultivo de forma permanente. Para evitarla se pueden aplicar anti-giberelinas o sistemas de cultivo alternativos en los que el explante no está continuamente en contacto con el medio.

El cultivo en medio líquido a gran escala se realiza en biorreactores. El sistema empleado es muy similar al desarrollado para bacterias y permite manipular material vegetal en grandes cantidades. El cultivo en medio líquido de células vegetales comenzó a utilizarse fundamentalmente en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico (Hezari y col., 1997), posteriormente se escaló este tipo de cultivo para el empleo de biorreactores (Liu y col., 1998). Mas tarde han comenzado a usarse los biorreactores en micropropagación, tanto en organogénesis (Ziv, 1999) como en embriogénesis (Ziv y col., 1995, Etienne-Barry y col., 1999).

Se han desarrollado diversos sistemas automatizados para la propagación de especies vegetales basados en inmersión temporal de los explantes. Alvard y col. (1993) emplearon una modificación de unidades de filtro autoclavables (Nalgene, Nalge. Co) (fotografías B1 y B2, Figura 6) obteniendo mejores resultados en multiplicación en plátano que con sistemas sólidos o líquidos. El mismo sistema se empleó en *Hevea brasiliensis* (Etienne y col., 1997). Cabasson y col. (1997) diseñaron un sistema más rudimentario en el que los explantes alternaban entre medio sólido (en placas Petri) y medio líquido (Erlenmeyer) para promover la embriogénesis somática en *Citrus*. Lorenzo y col. (1998) desarrollaron otro sistema para micropropagación de caña de azúcar consistente en dos compartimentos separados, uno para crecimiento de plantas y otro como continente del medio de cultivo, que pasaba de un compartimento a otro. Similar a éste fue el desarrollado por Escalona y col. (1999) para micropropagación de piña y por Jiménez y col. (1999) en patata. Teisson y col. (1996) diseñaron un sistema específico para este tipo de cultivo, los Rita's (fotografía B3, Figura 6) en este sistema de cultivo se han multiplicado numerosas especies como café (Etienne-Barry y col., 1999), eucalipto (Teisson y col., 1996) y patata (Teisson y Alvard, 1999), también se ha inducido embriogénesis somática (Etienne-Barry y col., 1999). Lorenzo y col. (2001) estudiaron la excreción de compuestos fenólicos al medio de cultivo y la brotación en caña de azúcar creciendo en inmersión temporal, viendo que parece existir una relación positiva entre estos dos parámetros. Otro parámetro importante en este sistema de

cultivo es el tiempo de inmersión que tiene efectos fisiológicos sobre el explante y regula los fenómenos de estrés (Martre y col., 2001).

Los sistemas de inmersión temporal suponen un ahorro en el coste de producción y de los riesgos de contaminación y es la técnica ideal para la micropropagación a gran escala (Teisson y Alvard, 1995).

La embriogénesis somática como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas: una enorme capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, y la posibilidad de obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente. Por contra presenta una serie de problemas, produciéndose anormalidades morfológicas, fisiológicas y genéticas en los cultivos. Se observan fenómenos de poliembrionía indeseables, falta de maduración y dormancia o germinación prematura de los embriones en cultivo. Otro de los «peros» de la técnica es que no puede aplicarse a gran escala más que en un, todavía no muy grande, número de especies, aunque continuamente se obtienen éxitos con nuevas especies gracias al activo trabajo que se desarrolla en este tema. Estos avances tienen su aplicación en propagación y mejora de plantas, en saneamiento de enfermedades e intercambio y/o conservación de germoplasma y en ingeniería genética y selección de especímenes transformados.

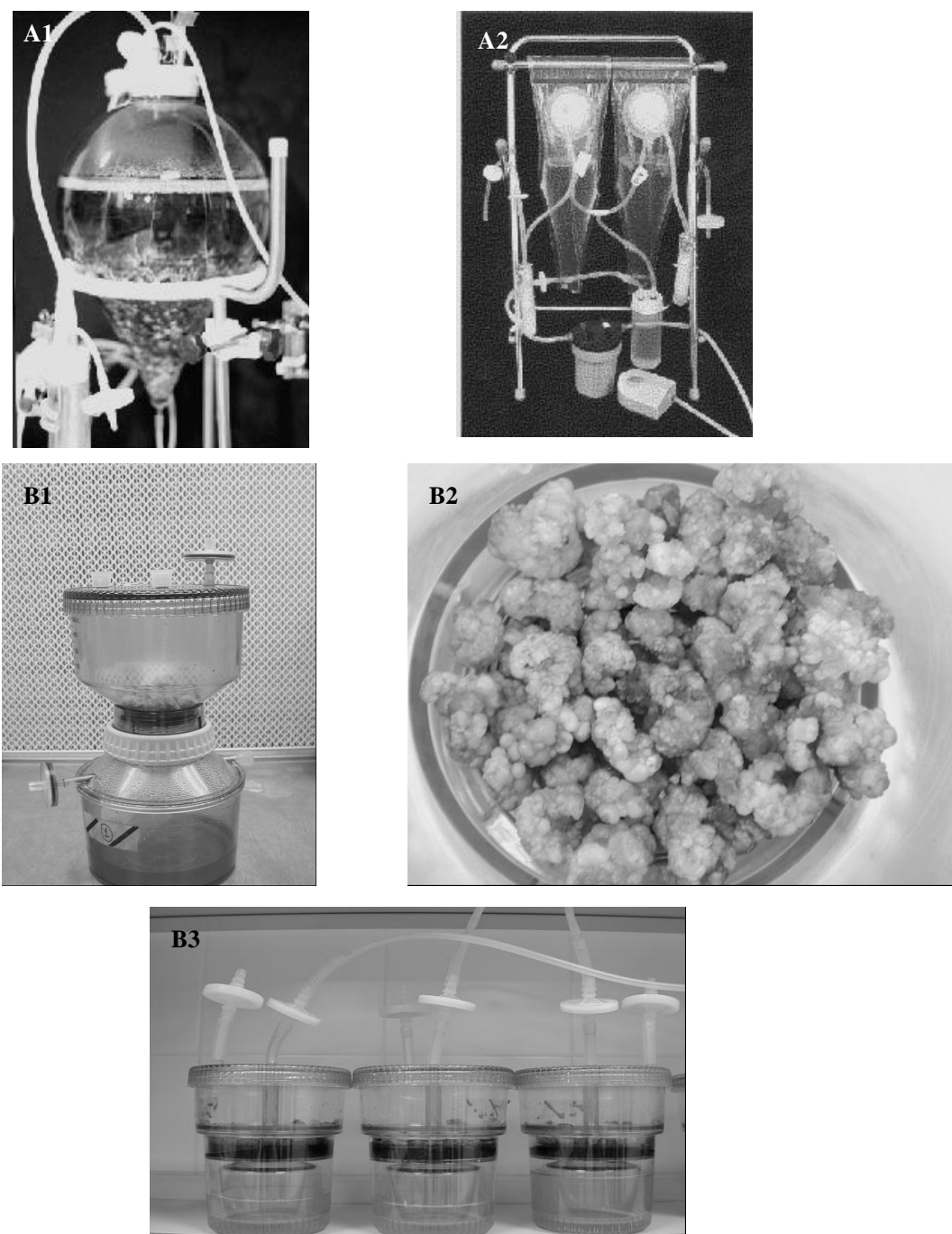


Figura 6. A1 y A2, diferentes sistemas de cultivo en medio líquido. B1, sistema adecuado a partir de una modificación de unidades de filtro Nalgene, B2, vista de callos en crecimiento. B3, Rita's en funcionamiento.

1.2.5. Embriogénesis somática

1.2.5.1 Introducción

La embriogénesis somática es un proceso por el cual partiendo de una célula somática se genera un embrión dipolar diferenciado. El embrión somático es morfológica y fisiológicamente similar a su equivalente zigótico. Este proceso se tiene lugar de forma espontánea en más de 60 familias de plantas, algunas tan importantes como las Compuestas, Crucíferas, Cucurbitáceas, Gramíneas, Rosáceas, Leguminosas, Palmáceas, etc. Es pues un proceso tan natural como la embriogénesis zigótica, con casos tan conocidos como el de los cítricos, en los que ambos tipos de embriogénesis ocurren casi simultáneamente en el interior de la semilla. *In vitro*, la primera referencia sobre cultivo de embriones somáticos fue comunicada por Waris en 1957 con *Oenanthae aquatica*; posteriormente Steward y Reinert (1958) los obtuvieron a partir de tejidos de zanahoria. A esta última especie modelo para el estudio de la embriogénesis somática se han añadido hasta la fecha más de 30 especies, algunas tan importantes como la alfalfa y leñosas forestales se multiplican comercialmente en la actualidad por este método (Mordhorst y col., 1997). En la Figura 7 se representa el esquema explicativo de los dos tipos de embriogénesis somática.

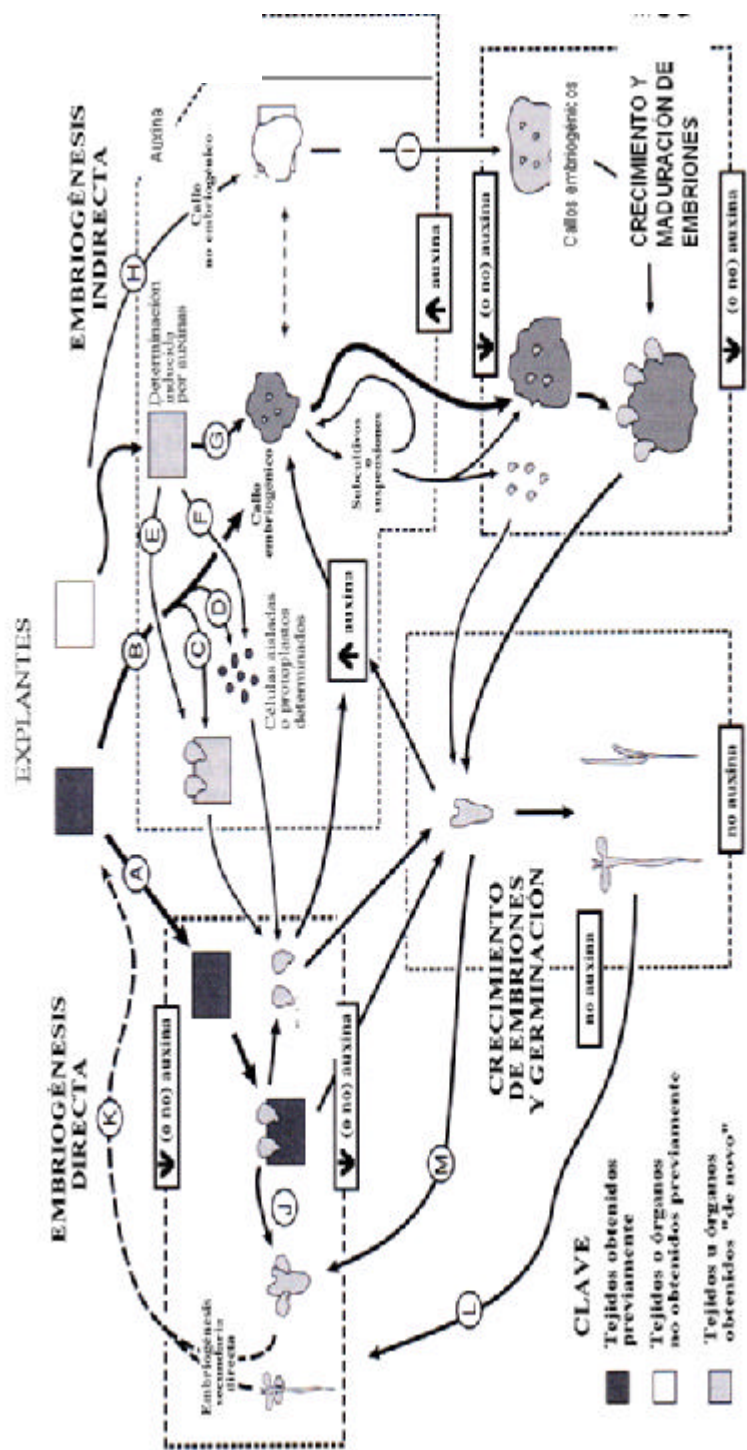


Figura 7. Esquema explicativo de los dos tipos de embriogénesis somática

Se pueden obtener embriones somáticos de muy diversas partes de la planta: ápices radiculares y caulinares, hipocótilos, pecíolos, pedúnculos, hojas jóvenes y en general tejidos y órganos con características embrionarias, meristemáticas o reproductivas (embriones e inflorescencias inmaduras, trozos de escutelo, nucela y endospermo, óvulos, tejido ovárico). Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*: directa e indirecta (Sharp y col., 1980). La forma directa implica la existencia de células somáticas predeterminadas a seguir la vía embriogénica; las células del explante primario se desarrollan para formar embriones (ej. nucela de cítricos). La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis. El proceso ocurre en dos etapas: en la primera fase células competentes aisladas en medios ricos en auxinas forman grupos de células embriogénicas (centros embriogénicos). En la fase dos, una vez subcultivados los centros embriogénicos se pasan a un medio sin auxinas y estos proliferan de forma lenta e indiferenciada. Posteriormente los embriones de dicotiledóneas pasan por los estados corazón, con dos cotiledones y un polo radicular, torpedo, con la elongación de los cotiledones; y un estado embriogénico avanzado donde los cotiledones y el polo radicular se diferencian perfectamente en el embrión (Fehér y col., 2002). Este proceso es el típico en plantas dicotiledóneas; en monocotiledóneas la fase inicial es similar con masas proembriogénicas de 6 a 8 células. En la fase inmediatamente posterior se desarrollan los embriones globulares que en este caso son mucho más difíciles de observar y confundibles con brotes meristemáticos. En plantas monocotiledóneas no hay estado corazón, los embriones globulares se desarrollan originando brotes y un polo radicular (similar al estado torpedo) y en el estado embriogénico avanzado se desarrollan las hojas jóvenes diferenciándose perfectamente los polos apical y radicular. Actualmente se han desarrollado protocolos de embriogénesis somática en la mayoría de las monocotiledóneas que forman bulbos o cormos, *Allium* (Phillips y col., 1987; Havel y col., 1988; Eady y col., 1998; Fereol y col., 2002), *Gladiolus* (Kamo y col., 1990; Stefaniak, 1994), *Narcissus* (Lynn y col., 2000), *Nerine* (Lilien-Kipnis y col., 1992), *Iris* (Jéhan y col., 1994; Radojević, 1992), entre otros. En *C. sativus*, George y col. (1992) fueron los primeros en observar la formación de embriones somáticos en explantes de regiones meristemáticas de cormo de azafrán cultivados en MS

suplementado con auxinas y citoquininas, aunque el desarrollo de estos embriones no fue completo, solo se apreció la formación de brotes. En 1994 Ahuja y col. obtuvieron las primeras plántulas regeneradas a partir de embriones somáticos de azafrán generados por cultivo de meristemos en medio LS, aunque no se ha realizado en esta especie una caracterización fisiológica del proceso hasta el momento presente.

La embriogénesis somática es un sistema ideal para realizar estudios sobre el proceso de diferenciación en plantas (Komamine y col., 1992). Aunque la descripción histológica ha sido extensamente registrada en varias especies vegetales y hay estudios histológicos que muestran el desarrollo de una célula hacia un embrión somático, estos estudios se ciernen básicamente a las especies modelo (Stefaniak y col., 1994).

1.2.5.2. Estudios histológicos

Los estudios histológicos del material son básicos para establecer claramente los estadios por los que atraviesa el desarrollo de los embriones somáticos. Las primeras observaciones con microscopía óptica de embriones somáticos fueron en suspensiones de zanahoria (Steward y col., 1958, Reinert, 1958). Como ya se ha comentado, la embriogénesis en plantas monocotiledóneas presenta algunas diferencias con respecto a dicotiledóneas. En 1991 Dheda y col. definieron histológicamente el origen de las masas proembriogénicas y el proceso de embriogénesis somática en *Musa* spp, anteriormente otros autores se habían limitado a mostrar las estructuras bipolares del embrión (Escalant y Teisson, 1989, Novak y col., 1989). Se han realizado cortes histológicos de las fases de desarrollo de los embriones somáticos en maíz (Green, 1982), *Allium* (Buiteveld y col., 1994; Eady y col., 1998; Fereol y col., 2002), *Gladiolus* (Stefaniak y col., 1994) *Iris* (Radojević y col., 1992) etc. En azafrán los primeros en establecer una definición a nivel histológico de las fases de desarrollo del embrión fueron George y col., 1992. En este trabajo se presentó empleando microscopía electrónica una sección transversal de un embrión globular y de un embrión desarrollado con polos apical y radicular, estado similar al torpedo en dicotiledóneas. En 1994, Ahuja y col mostraron mediante microscopía electrónica de barrido el desarrollo secuencial de los callos embriogénicos hasta embriones bipolares.

1.2.5.3 Desarrollo de los embriones

1.2.5.3.1 Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo es importante en todas las fases de desarrollo de los embriones somáticos, en la inducción y en el posterior desarrollo y crecimiento de los embriones hasta plantas completas. Tanto los medios de cultivo base (composición en sales y vitaminas) como las combinaciones de reguladores de crecimiento varían dependiendo de la especie vegetal. La fuente de carbono suele ser sacarosa aunque en este factor existen también variaciones respecto al tipo de azúcar y a las dosis empleadas, en función de la respuesta esperada.

Como medio de cultivo base en embriogénesis somática se emplea generalmente MS, dado que es el medio más rico en nitrógeno (50-60mM más que en el medio del que deriva, White, 1939) y el nivel de nitrógeno es muy importante cualitativa y cuantitativamente en la inducción de embriogénesis somática. El amonio es imprescindible para la inducción de embriogénesis en cultivo de células de zanahoria (Halperin y col., 1965), en alfalfa (Meijer y col., 1987) y en café (Fuentes-Cerda y col., 2001) entre otros. Además es necesaria la presencia de nitrato para el desarrollo y crecimiento de los embriones (Wetherell y col., 1976), el ratio amonio/nitrato tiene una importante influencia por ejemplo en la morfología de plantas regeneradas en maíz (Grimes y col., 1990). Hidrolizados de proteínas que contienen mezclas complejas de aminoácidos pueden reemplazar el efecto de la fuente de nitrógeno en suspensiones de zanahoria (Anderson, 1976) y callos de *Nicotiana tabacum* (Müller y col., 1978), aminoácidos concretos pueden tener efecto en fenómenos de embriogénesis como ocurre con la prolina en *Iris* (Jéhan y col., 1994).

Otro componente importante es el fósforo, elemento vital para la bioquímica de las plantas. El nivel de fosfato en el medio MS es reducido y el fósforo es el primer elemento en agotarse en los medios de cultivo (Dougall, 1980). Papachatzi y col. (1981) comprobaron que la adición de NaH_2PO_4 al medio MS en el cultivo de *Hosta decorata* promovía el crecimiento y la producción de brotes, este mismo efecto se constató en callos cormogénicos de azafrán (Alfaro, 2000).

La fuente de carbono se incorpora al medio base durante la inducción, en el desarrollo de los embriones es un factor muy importante, además de ser la fuente de energía que mantiene el potencial osmótico en el medio. Como se indicó anteriormente la sacarosa

es la fuente de carbono universal en micropropagación, sin embargo existen situaciones especiales en las que es ventajoso el uso de otros mono, di y trisacáridos, e incluso derivados alcohol de éstos. En *Citrus deliciosa* la galactosa induce la formación de embriones somáticos pero es necesario un medio con sacarosa posteriormente para que éstos se desarrollen correctamente (Cabasson y col., 1995). En *Spinaca oleracea* el empleo de fructosa y rafinosa incrementa el numero de embriones somáticos (Komai y col., 1996), la maltosa induce la formación y desarrollo de embriones somáticos en *Hevea brasiliensis* (Blanc y col., 2000) y la embriogénesis somática de *Hordeum vulgare* precisa del cambio de sacarosa por maltosa (Scott y Lyne, 1994). En rosáceas algunas variedades crecen mejor con sorbitol y otras con mezclas de sorbitol y sacarosa (Albrecht, 1986). Bellettre y col. (1999) estudiaron el efecto de pretratamientos con glicerol sobre la embriogénesis somática en *Cichorium*, constatando un efecto positivo en la inducción y sincronización del desarrollo de los embriones. El aumento en la dosis de sacarosa en cultivo de ajo puede inducir la formación de bulbos (Zel y col., 1997). Existen por otra parte una serie de compuestos, de composición desconocida o no totalmente conocida, que se añaden a los medios de cultivo de forma general para provocar ciertas respuestas o simplemente para mejorar la respuesta. El extracto de levadura por ejemplo favorece la formación directa de embriones adventicios en *Linum* (Pretova y Williams, 1986), el extracto de patata induce la formación de embriones somáticos en patata (Sopory y col., 1978), la leche de coco es necesaria para el desarrollo de embriones tempranos de *Datura stramonium* (Van Overbeek y col., 1941, 1942) y se ha empleado en el cultivo de callos de azafrán (González, 1998; Piqueras y col., 1999).

1.2.5.3.2 Reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento suponen el componente más importante de los medios de cultivo en cuanto a su influencia en los procesos morfogénicos de las células y tejidos vegetales. Tradicionalmente se conocen como reguladores del crecimiento vegetal en este sentido: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Existen muchos otros reguladores que se emplean con menor frecuencia en cultivos vegetales, anti-giberelinas como el paclobutrazol (PAC) y el ancimídol, las denominadas nuevas hormonas o también segundos mensajeros, brasinólidos, oligosacarinas y jasmonatos (Creelman y col., 1997a) e incluso poliaminas (PAs) entre

otros. En todo caso la respuesta en el medio de cultivo dependerá del balance de los diferentes reguladores empleados entre sí y con los niveles endógenos del explante y de las interacciones con factores como el tipo de explante, genotipo de la planta madre y condiciones generales de cultivo.

Las auxinas se emplean a menudo en la inducción de embriogénesis somática en plantas. Niveles elevados (desde 0,1 a varios miligramos) de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) ácido naftalenacético (ANA), ácido 3-indol acético (AIA) o ácido 3-indol butírico (AIB) entre otros (Dicamba, Picloram etc) activan el ciclo celular e inician la formación de embriones en numerosas especies tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. El cultivo de cereales precisa 2,4D para inducir la formación de embriones. Posteriormente el 2,4D es retirado del medio para facilitar la diferenciación (Bhaskaran y Smith, 1990). En *Dactylis glomerata*, sin embargo, es necesario el Dicamba para inducir y mantener los cultivos embriogénicos (Hanning y col., 1982; Gray y col., 1984). Las plantas productoras de bulbos y cormos presentan diferencias en cuanto a los requerimientos de reguladores en embriogénesis: picloram en los géneros *Freesia* (Bach, 1992) y *Lilium* (Okazaki y col., 1995) y 2,4D en *Iris* (Jéhan y col., 1994) y *C. cancellatus* (Karamian y col., 2001). En *C. sativus* también se ha usado 2,4D (George y col., 1992) aunque Ahuja y col., 1994, obtuvieron embriones somáticos de azafrán con ANA. En otras especies como *Pisum sativum* (Ozcan y col., 1993) y *Arachis hipogaeae* (Ozias-Akins, 1989) se ha comprobado que ANA es más efectivo que 2,4D en embriogénesis. Sofiari y col., 1997, compararon el efecto de 2,4D y ANA en la inducción de embriogénesis somática en Cassava observando que aunque el 2,4D era necesario en embriogénesis somática primaria, la embriogénesis secundaria sucedía en presencia de ANA. En *Gladiolus* se generan embriones somáticos en medios con 2,4D (Stefaniak, 1994), ANA y Dicamba (Kamo, 1994) aunque con diferentes rendimientos.

La función de las citoquininas en el cultivo de tejidos es la de estimular la división celular y controlar la morfogénesis. Se incorporan en bajas concentraciones al medio de cultivo en la inducción de callos embriogénicos en algunas especies (Fujimura y Kosamine, 1975), sin embargo en monocotiledóneas como *Dactylis glomerata* concentraciones inferiores a 0,001µm inhiben la formación de embriones. Incluso en algunos genotipos la presencia de elevadas concentraciones endógenas de citoquininas impiden la embriogénesis (George, 1993). Otra de las funciones de las citoquininas es la

de romper la dormancia (fenómeno muy general en plantas bulbosas y con cormo), sin embargo no se usan generalmente con este propósito puesto que en dosis elevadas pueden provocar alteraciones en la morfogénesis (George, 1996). Para romper la dormancia en plantas bulbosas y con cormo se emplean tratamientos en frío en *Narcisos* (Hussey y Hilton, 1980), *Hyacinthus orientalis* (Bach y col., 1992) *Lilium longiflorum* (Higgins y Stimart, 1990) o tratamientos con giberelinas (*Narcissus* (Seabrook, 1990)). Las citoquininas parecen estar relacionadas también con el metabolismo de carbohidratos (Scott y col., 1964; Torpe y Meier, 1972).

Las citoquininas naturales son Zeatina (z), Dihidrozeatina y 2-Isopentil Adenosina (2ip), pero generalmente no se emplean éstas sino derivados sintéticos como Benzilaminopurina (BAP) y Kinetina (Kn), derivados de bases púricas, y Tidiazuron (TDZ), derivado de fenilurée, entre otros. El efecto de cada una de estas citoquininas en la inducción de embriogénesis dependerá de las características del tejido y de las interacciones con otros reguladores. En *Allium*, por ejemplo, puede inducirse la embriogénesis somática empleando únicamente auxinas como Picloran (Eady y col., 1998), o por combinación de auxinas y citoquininas, 2,4D y BAP (Fereol y col., 2002). En *Gladiolus* se emplea Zeatina (Stefaniak, 1994) pero estudios de Kamo en 1994 mostraron que, dependiendo del cultivar estudiado, BAP y 2ip podían reportar frecuencias embriogénicas mayores y sobretodo mayor tasa de regeneración en plantas completas. En el género *Iris* se ha inducido embriogénesis somática con Kn (Radojević y col., 1992; Jèhan y col., 1994). TDZ y CPPU (N-(2-cloro-4-piridil)-N¹-fenilurée) aplicados en pulsos entre los diferentes subcultivos inducen la formación de brotes en rosa (Singh, 2001).

Existen diferencias importantes en los efectos de las diferentes citoquininas, Victor y col. (1999) compararon el efecto de BAP con el de TDZ en la inducción de embriogénesis somática en cacahuete. En este trabajo se trataron semillas de cacahuete con diferentes concentraciones de BAP y TDZ, tanto incluidas en el medio de cultivo como aplicadas directamente en las semillas por infiltración. Únicamente las semillas crecidas en medios con TDZ originaron embriones somáticos (en las crecidas en medios con BAP aparecían brotes que no se correspondieron con embriones). Por el contrario las semillas infiltradas con BAP regeneraron y las tratadas con TDZ no. En la inducción de callos embriogénicos en azafrán se ha empleado Kn, en combinación con 2,4D en

medio base MS (George y col., 1992) o BAP en combinación con ANA en medio base LS (Ahuja y col., 1994) los resultados fueron similares con las dos combinaciones. Como norma general los procesos morfogénicos en plantas requieren la presencia de los dos tipos de reguladores hormonales y la respuesta observada dependerá en gran medida de la relación auxina/citoquinina: una relación alta (más auxina) origina formación de raíces, callos en monocotiledóneas y los primeros estadios de embriogénesis; una relación baja (mas citoquinina) brotes adventicios, callos en dicotiledóneas y brotes axilares (George, 1993). Fei y col. (2002) estudiaron el cambio en la relación auxinas/citoquininas necesario para el desarrollo de *Buchloe dactyloides*. Son necesarias elevadas dosis de auxinas (2,4D) y bajas de citoquininas (BAP) para la inducción de embriogénesis. Gradualmente se va aumentando la concentración BAP y disminuyendo la de 2,4D para que los embriones maduren y se desarrolen correctamente.

Actualmente se conocen 110 diferentes giberelinas; entre ellas existen pequeñas diferencias en la estructura química que se manifiestan en grandes diferencias en la actividad biológica. Alrededor del 30% de las giberelinas son biológicamente activas. Tienen una actividad compleja dado que regulan la actividad enzimática a muchos niveles; por lo general inhiben la embriogénesis somática (Fujimura y Komamine, 1975) pero estimulan el crecimiento y desarrollo de los embriones una vez formados en diversas especies como maíz (Lu y col., 1982), césped de guinea (Lu y Vasil, 1981, 1982) etc. Las anti-giberelinas también son muy empleadas en micropropagación como retardantes del crecimiento en plantas en general. Se denominan así porque sus efectos son revertidos con la aplicación de giberelinas. Se han empleado por ejemplo en aclimatación de plantas puesto que reducen el crecimiento de brotes y la susceptibilidad de la planta (Ziv, 1992a) y disminuyen la dominancia apical en brotes de *Asparagus* (Khunachac y col., 1987). Se emplean mucho en cultivos en medio líquido para evitar los fenómenos de hiperhidratación por crecimiento excesivo de los tejidos en este sistema de cultivo, donde la accesibilidad a los nutrientes es mucho mayor. La estructura de las anti-giberelinas es variada, desde estructuras sencillas como Chloromequat y Diaminozida, dobles anillos en el Ancimidol o anillos triazol en el Paclobutrazol.

Los efectos del etileno en embriogénesis somática son algo controvertidos. Se ha documentado su efecto como inductor de la embriogénesis somática en anteras de tabaco (Dunwell, 1979) y en óvulos de *Citrus sinensis* (Kochba y col., 1978), pero en otros casos es un inhibidor de los procesos embriogénicos (Kong y Yeung, 1994). En azafrán el etileno se ha empleado para inducir la formación de yemas en fragmentos de cormo (Plessner y col., 1990).

Aminoetoxivinilglicina (AVG) y bencilisotiocianato (BITC) son inhibidores del etileno que bloquean la ACC-sintetasa (enzima implicada en la síntesis de etileno). La putrescina (Put) es un antagonista del etileno y el tiosulfato de plata (en general los iones plata) inhiben los receptores de etileno. Todos estos compuestos previenen los efectos del etileno en plantas, bloqueando su síntesis o bien sus mecanismos de acción. La acumulación de etileno en los cultivos puede inhibir la brotación. Este efecto se ha visto en cultivos de *Beronia x richmondensis* (Ringe, 1972), *Nicotiana* sp. (Tran Thanh Van, 1973) entre otras, aunque su actividad en procesos de embriogénesis y organogénesis parece depender de los niveles alcanzados en el interior del frasco de cultivo (Gonzalez y col., 1997). El ácido salicílico y el acetilsalicílico como captadores de radicales libres bloquean el paso de ACC (ácido 1-aminociclopropano1-carboxílico) a etileno por lo que también funcionan como inhibidores del etileno (Leslie y Romani, 1986, 1988). Estos compuestos parecen estar relacionados también con los mecanismos de defensa en plantas mediante el incremento de los niveles de peroxidasas y quitinasas (Martínez y col., 2001).

El ácido jasmónico (AJ) y su metil ester (metil-jasmonato) son derivados del ácido linoléico y funcionan como reguladores hormonales vegetales (Koda y col., 1991). Actúan en concentraciones muy bajas, con efectos positivos y negativos y actividad sinérgica y antagónica por combinación con otros reguladores. Sus funciones son muy variadas: retraso de la germinación del polen, crecimiento de raíces e inhibición la germinación de semillas. Por otro lado regulan la acumulación de proteínas de reserva en tejidos vegetativos en los que las concentraciones son muy altas y desencadenan la síntesis de proteínas antifúngicas, por lo que constituyen una defensa ante patógenos (Creelman y col., 1997b). Esta diversidad en las funciones de los jasmonatos se debe a que regulan la expresión de numerosos genes en plantas (Robert y col., 1997). Por

ejemplo, estimulan el crecimiento y formación de brotes en patata (Ravnikar y col., 1992) y ajo (Ravnikar y col., 1993); elicitán la producción de antocianos en cultivos celulares de arándano (Yimin Fang y col., 1999); inducen la formación de órganos de reserva en dicotiledóneas como la patata o achicoria de Jerusalem (Koda, 1997) y en monocotiledónas, *Dioscorea spp.* (Jasik y Mantell, 2000), ajo y cebolla (Koda, 1997) y *Narcissus* (Santos y Salema, 2000). El AJ está relacionado también con el metabolismo de carbohidratos y la acumulación de reservas. Induce la acumulación de almidón en patata (Ravnikar y col., 1995), inhibe la síntesis de polisacáridos de pared celular como la celulosa y también la elongación celular provocada por AIA (ácido indolacético). Esto último se ha observado en monocotiledóneas y no en dicotiledóneas (Miyamoto y col., 1997). Existe por tanto una interacción en el cultivo entre las dosis de jasmonato y el porcentaje de sacarosa aplicados. Kovac y Ravnikar (1998) pusieron en evidencia la relación entre la concentración de sacarosa y la dosis de AJ en la acumulación de pigmentos fotosintéticos en patata, Dbeljak y col. (2002) determinaron que la combinación óptima para la tuberización *in vitro* de *Pterostylis sanguinea* era de 5 g/l de sacarosa y 5 µm de AJ.

Las poliaminas son un grupo muy amplio que engloba todos aquellos compuestos con actividad biológica que contienen grupos amino-alifáticos. Son moléculas básicas caracterizadas por su carga positiva a pH fisiológico. Esta carga determina que se unan firmemente a moléculas con carga negativa como ácidos nucleicos, fosfolípidos ácidos y diversas proteínas. Tienen una actividad moduladora de la actividad enzimática por unión a enzimas (Bouchereau y col., 1999). Están implicadas en floración (Evans y Malmberg, 1989), enraizamiento y brotación (George, 1993), embriogénesis somática (Minocha y col., 1995), y formación y maduración de frutos (Serrano y col., 1995). Las características de estos compuestos y su amplio papel en las diferentes fases de desarrollo de los embriones somáticos se presentan más adelante en el apartado correspondiente a PAs.

Otros reguladores importantes son el floriglucinol (polifenol estimulante de la morfogénesis) y el H₂O₂. Se ha demostrado el efecto promotor del floriglucinol en la brotación en diversas variedades de *Malus* y *Prunus*. La actividad promotora de este

compuesto depende de la variedad sobre la que se aplica y del momento del subcultivo o estado fisiológico en el que se encuentra el explante (Zimmerman y Broome, 1980).

El H_2O_2 , como representante del grupo de moléculas de oxígeno reactivo (ROS) tiene importantes efectos en el metabolismo y fisiología de los organismos (Gutteridge, 1990). Se conoce también su actividad como transductor de señales de defensa en plantas (Apostol y col., 1989) y como inductor de la expresión génica y síntesis de proteínas (Burdon, 1995). Kairong y col. (1999) determinaron su efecto en embriogénesis somática de *Lycium Barbarum*, la mayor respuesta se obtuvo con pretratamientos de 15 días con H_2O_2 200 μ M.

1.2.5.4 Biología molecular en embriogénesis

El proceso de embriogénesis somática en plantas engloba una importante regulación de la expresión génica a diferentes niveles. Mediante el estudio de suspensiones celulares se han aislado numerosos genes que se expresan específicamente durante la embriogénesis somática (Kawahara y col., 1995, Sato y col., 1995). Quiroz-Figueroa y col. (2002) estudiaron las diferencias a nivel de expresión de suspensiones celulares de café, divididas en dos grupos, obtenidas a partir de callos embriogénicos y a partir de callos no embriogénicos. En este trabajo se puso de manifiesto que existen diferencias importantes de expresión entre los dos tipos de suspensiones. La proporción de expresión de genes reguladores fue el doble en suspensiones embriogénicas que en no embriogénicas. Zimmerman (1993) encontró también numerosos transcritos asociados a cada una de las fases de desarrollo de los embriones somáticos. La mayor parte de los estudios sobre genes de embriogénesis están referidos a dicotiledóneas, fundamentalmente en zanahoria y en *Arabidopsis*, Lin y col. (1996) estudiaron las diferencias de expresión entre embriones globulares y semillas de zanahoria. Aislaron treinta y ocho genes cuya expresión se veía alterada en los embriones globulares con respecto a las semillas. Estos genes correspondieron fundamentalmente a las categorías: proteínas de la pared celular, enzimas, proteínas PR (relacionadas con patogénesis), proteínas de choque térmico, proteínas LEA, oleosinas, proteínas de unión a globulina, histonas, proteínas ribosomales, factor 1- α de elongación y proteínas de fusión a

ubiquitina, se trata fundamentalmente de proteínas relacionadas con fenómenos de estrés y de división y crecimiento celular.

Recientemente se han identificado una serie de genes relacionados directamente con el proceso de embriogénesis somática. Algunos genes como SERK (gen que codifica para un receptor quinasa de embriogénesis somática) (Schmidt y col., 1997; Somleva y col., 2000; Hecht y col., 2001,) o JIM8 (epítipo de pared celular) (Pennell y col., 1992) se han empleado como marcadores para definir el estado embriogénico. Otros como *bbm* (“Babyboom”) (Boutilier y col., 2000), *lec1* (Lotan y col., 1998) y *lec2* (Stone y col., 2001) son capaces de inducir el desarrollo de embriones en células somáticas. Concretamente en azafrán Alvarez-Ortí (2003) encontró una proteína relacionada con embriogénesis somática durante la dormancia del cormo (BM956319). En la Tabla 2 se resumen algunos de los genes relacionados con embriogénesis somática clonados en diferentes especies.

Gen	Producto	Callo	Embrión Somático	Embrión Zigótico	Referencia
DC8	LEA (Grp3)	+	++++(C)	++++	Borkird y col., 1986. Franz y col., 1989. Hatzopoulos y col., 1990a. Goupil y col., 1992.
DC49	-	++	++++	?	Choi y col., 1987
DC59	oleosina	+	++++(C)	++++	Hatzopoulos y col., 1990b.
DC3	LEA (Grp3)	+	++++ (PEM,G,T)	?	Wilde y col., 1988 Vivekananda y col., 1992.
EMB1	LEA (Grp1)	+	+++ (G,T)	++++ (semilla)	Ulrich y col., 1990, Wurtele y col., 1993.
EP2	LTP	+	++++	++++	De Vries y col., 1988. Serk y col., 1991.
EP3	Quitinasa	?	++++	?	De Jong y col., 1992.
DC2.15	Proteína rica en prolina	++	++++ (G,C,T)	?	Aleith y Richter, 1990.
DC7.1	Proteína rica en glicina	++	+++ (G,C)	?	

Gen	Producto	Callo	Embrión Somático	Embrión Zigótico	Referencia
EF1- α	Factor de elongación	+++	++++ (G,polisomas)	?	
CEM1	EF1- α	?	+++ (PEM) ++++ (G,C,T)	?	Kawara y col., 1992.
Hsp18	Proteína de choque térmico	?	+++	?	Györgyey y col., 1991
β -1.3 glucanasa	glucanasa	?	+++	?	Helleboid y col., 2000
Serk	Receptor kinasa	?	+++	?	Schmidt y col., 1997.
WUS/ PGA6	Proteína de crecimiento celular	?	+++	?	Zuo y col., 2002

+ detectable en poca cantidad

++++ muy abundante

PEM, Masas proembriogénicas

G, estadio globular

T, estadio torpedo

C, estadio corazón

? no descrito

Tabla 2. Genes cuya regulación se ha detectado durante el proceso de embriogénesis

1.3. EVOLUCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE DURANTE EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS

Como consecuencia de la vida aeróbica durante la reducción de O_2 a H_2O se originan especies de oxígeno activo (AOS, ROS), radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Figura 8), estas moléculas funcionan como señales en la muerte celular, en procesos de crecimiento y desarrollo (interviniendo en el ciclo celular y en la replicación del ADN) y en la estimulación de la embriogénesis somática (Vranová y col., 2002).

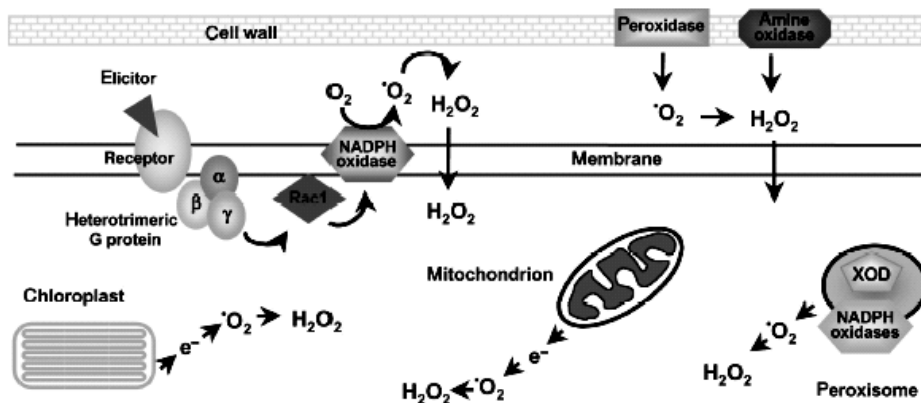


Figura 8. Fuentes de AOS en plantas (XOD, xantina oxidasa).

Las plantas poseen sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) de defensa contra los efectos negativos de las especies de oxígeno activo (AOS) (Figura 9). Las fuentes de AOS en plantas son variadas, el estrés ambiental limita la fijación de dióxido de carbono, también la sequía, el estrés salino, el ozono, las elevadas temperaturas y heladas reducen la regeneración del $NADP^+$ mediante el ciclo de Calvin. Esto tiene como consecuencia la oxidorreducción de la cadena transportadora de electrones y por tanto la formación de radicales superóxido (Krause, 1994). Los procesos catabólicos como el catabolismo de lípidos y de ácidos nucleicos generan también H_2O_2 (Somerville y col., 2000; del Río y col., 1998 respectivamente). Otra fuente de AOS en plantas son las reacciones de detoxificación catalizadas por los citocromos, especialmente el citocromo P450 (Urban y col., 1997). Como se señaló anteriormente el grupo de moléculas de oxígeno reactivo (ROS, Reactive Oxygen Species) tienen

importantes efectos en el metabolismo y fisiología de los organismos (Gutteridge, 1990). Recientemente Van Breusegen y col. (2001) han sugerido la relación entre los radicales peróxido y superóxido y la fisiología del desarrollo en plantas. Estudios de los mecanismos de defensa en plantas han indicado que estos compuestos cumplen un papel importante en los mecanismos de defensa, sobre todo actúan contra el estrés oxidativo mediante incrementos en la expresión de genes relacionados con antioxidantes en las células (Chen, 1991). Por otro lado se ha observado que los incrementos en el nivel de peróxido de hidrógeno son beneficiosos para eliminar infecciones por parte de patógenos (Levine y col., 1996).

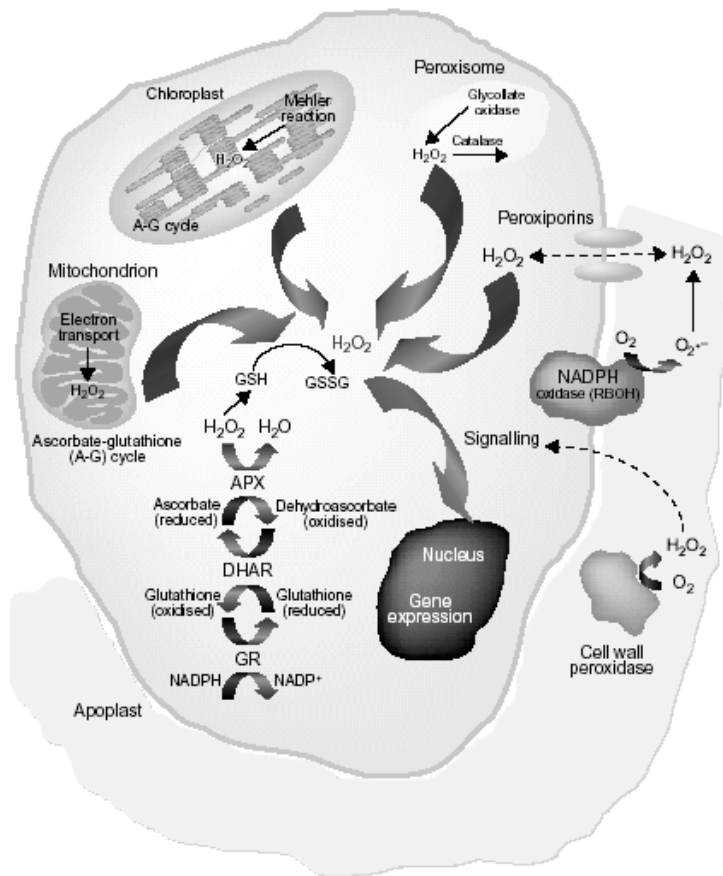


Figura 9. Ciclo del peróxido de hidrógeno en plantas.

La regeneración de plantas y también la embriogénesis en plantas comprenden numerosos procesos en los que está implicado el peróxido de hidrógeno (Earnshaw y Johnson, 1987; Kairong y col., 1999; Tian y col., 2003). De Gara y col. (1997) estudiaron el efecto del peróxido de hidrógeno en combinación con el ciclo glutatión-ascorbato sobre el mantenimiento de la plasticidad de la pared celular y la estimulación de la división celular organizada. Estos dos procesos son imprescindibles en los estados iniciales de formación y desarrollo de los embriones somáticos. En este contexto Bagnoli y col. (1998) consideraron como marcadores de los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos a los cambios en las isoformas de la catalasa y de la superóxido dismutasa.

1.4. POLIAMINAS EN EMBRIOGÉNESIS

1.4.1. Introducción

Las poliaminas (PAs) son, como ya se comentó anteriormente, aminos de bajo peso molecular. Aunque no se conocen las funciones específicas de estas moléculas parece claro que son necesarios niveles óptimos de las mismas para el crecimiento y desarrollo de los organismos (Cohen, 1998). Se consideran como reguladores del crecimiento y desarrollo de plantas por su efecto demostrado sobre el crecimiento, la división y la diferenciación celular a bajas concentraciones (Smith, 1985). Los precursores de PAs son aminoácidos. A partir de arginina y ornitina se origina putrescina (Put) (Figura 10), que es la diamina precursora de espermidina (Spd) (triamina) y ésta de la espermina (Spm) (tetraamina). Por degradación de putrescina se genera el 1,3 diaminopropano (Dap). La cadaverina (Cad) es otra diamina menos frecuente en los tejidos vegetales, se origina a partir de lisina. La arginina puede seguir otra ruta, por acción de la arginasa se transforma en ornitina con desprendimiento de urea y por descarboxilación mediante la enzima arginina descarboxilasa en agmatina. Existen otras muchas PAs descubiertas de las que no se sabe apenas nada e incluso muchas por descubrir. La biosíntesis de PAs está muy relacionada con la del etileno, ya que la S-adenosilmetionina es el intermediario común de ambas rutas metabólicas y el reparto de la S-adenosilmetionina tiene importantes implicaciones fisiológicas (las PAs inhiben la síntesis de etileno (Apelbaum y col., 1981). Existen numerosas sustancias capaces de bloquear las rutas de síntesis de PAs en diferentes puntos. Su estudio ha sido muy útil a la hora de dilucidar el papel de las PAs en los procesos morfogénicos (Yadav y Rajam, 1997). Compuestos como la α -difluorometilornitina (DMFO), que inhibe la formación de putrescina a partir de ornitina y es capaz de proteger a las plantas del ataque de hongos (Weinstein y Galston, 1988), aunque sobre otras plantas como los cereales no parece tener efecto (Flores y Galston, 1984). Otros compuestos son la n-butilamina y la β -hidroxietilhidracina.

Las PAs se pueden encontrar en la naturaleza en tres formas: libres en el citoplasma celular; conjugadas generalmente a ácidos hidroxicinámicos como el ácido p-cumárico, ferrúlico o caféico (Smith y col., 1983); o ligadas a macromoléculas como proteínas

(Martin-Tanguy, 1997). Aunque las investigaciones se han centrado más en la fracción libre de las PAs parece evidente que los procesos de conjugación y ligación juegan un importante papel en fenómenos de crecimiento y desarrollo de plantas.

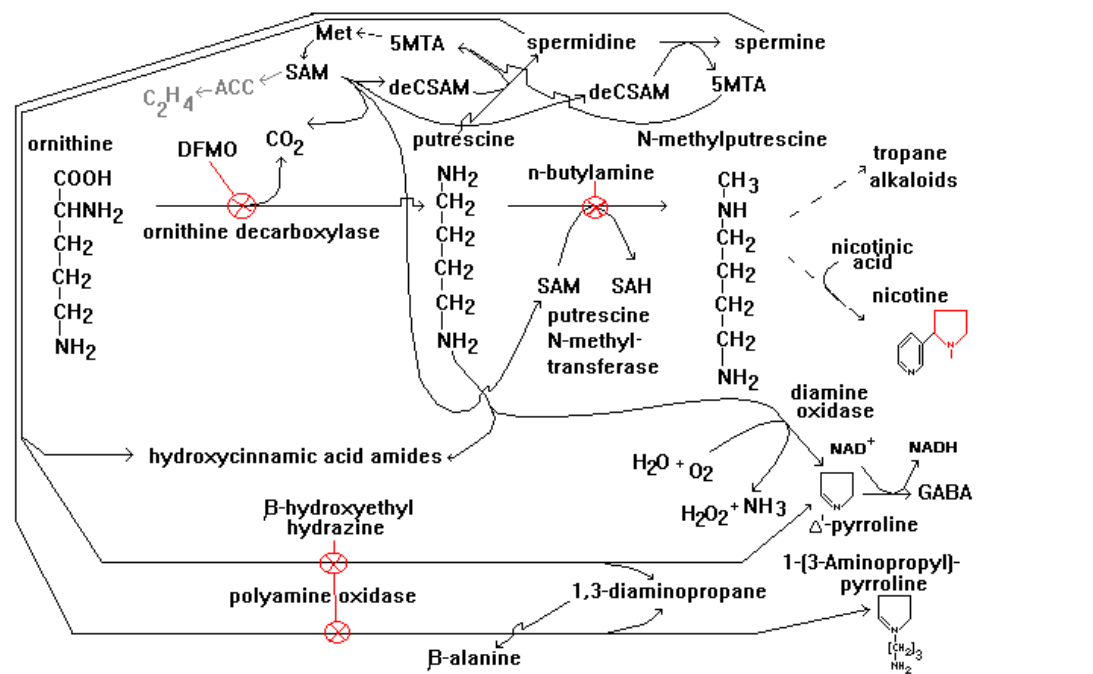


Figura 10. Ruta de síntesis de las PAs más abundantes donde se señalan puntos importantes de control.

1.4.2. Poliaminas y embriogénesis

Por medio de manipulación de las rutas biosintéticas de PAs, con inhibidores de sus reacciones de síntesis o empleando plantas transgénicas afectadas en estas rutas, se ha demostrado que, en numerosas especies, la embriogénesis somática está relacionada con el metabolismo de PAs (Faure y col., 1991; Kevers y col., 2000; Minocha y col., 1995). Litz y Schaffer (1997) detectaron niveles de PAs mucho mayores en callos no embriogénicos que en callos embriogénicos de *Mangifera indica*. Pedroso y col (1997) estudiaron explantes de hoja de *Camellia japónica*, aunque no aparecieron diferencias

en el total de PAs (libres y conjugadas) entre regiones embriogénicas y no embriogénicas ni antes ni durante la embriogénesis. Se pone de manifiesto en este trabajo una variación en las diferentes PAs estudiadas (Put, Spd y Spm) y en el estado de estas (libres o conjugadas) que puede regular la formación y desarrollo de los embriones. Minocha y col. (1993) determinaron el efecto del nivel endógeno de la Put en embriogénesis de *Picea abies* y *Picea rubens*. Además del efecto de la PAs endógenas se han realizado estudios sobre como afecta la aplicación exógena de PAs y sus precursores a la embriogénesis. Kevers y col. (2000) detectaron un incremento en el numero de embriones producidos por cultivo de secciones de raíz de *Panax ginsen* al adicionar al medio ornitina y arginina (precursores de la síntesis de PAs). La Put parece ser inductora de embriogénesis en muchas especies (Danin y col., 1993; Minocha y col., 1995; Pedroso y col., 1997; Yadav y Rajam, 1997), aunque en otros casos el desarrollo de embriones es máximo con adición de Spd (Kevers y col., 2000). El ratio Put/Spd puede ser un factor importante en el desarrollo de los embriones somáticos, Faure y col. (1991) estudiaron la variación de este ratio entre embriones somáticos y embriones zigóticos, determinando que el valor era mucho mayor en embriones somáticos (también con mayores niveles de PAs libres) que en embriones zigóticos. Además se producía una disminución progresiva del valor de este ratio en la maduración de los embriones. Previamente Montague y col. (1978) habían encontrado también una disminución del valor Put/Spd en el estudio de varios estadios de desarrollo embrionario de células de zanahoria.

En plantas con bulbos y cormos se han realizado pocos estudios sobre los niveles de PAs. En brotes de *Narcissus leonensis* se observó que la aplicación de Dap exógeno mejoraba la regeneración *in vitro* (Riera y col., 1997). Estudios en bulbos de narciso revelaron gran cantidad de Put y Spd y sorprendentemente cantidades elevadas de Dap (Riera y col., 1997). En bulbos de azafrán obtenidos en el campo se apreciaron diferencias a lo largo del ciclo biológico, siendo más abundantes las PAs libres en estados vegetativos y las conjugadas en cormos florales. Además la mayor parte de la Put aparecía conjugada en todas las fases y solo se encontró libre durante la dormancia. Los niveles de Spd y Spm libres aumentaron rápidamente durante la brotación y disminuyeron en etapas posteriores coincidiendo con un aumento de los niveles de Spd y Spm conjugadas (Jirage y col., 1994).

1.4.3. Poliaminas y ácido jasmónico

Recientemente se ha observado que los tratamientos con jasmonatos inducen acumulación de otros metabolitos secundarios como las PAs Put, Spd y Spm unidas covalentemente a ácidos hidroxicinámicos como hidroxicinamoil-amidas (HCAs) (Lee y col., 1997; Mader, 1999; Biondi y col., 2000). En plantas de tabaco estos compuestos se acumulan durante la floración y también como consecuencia de la infección por patógenos (Flores y Martín-Tanguy, 1991). Aumentan en los tejidos cultivados *in vitro* como respuesta a la adición exógena de hormonas (Torrigiani y col., 1987; Burtin y col., 1989; Scocciantti y col., 2000) pero su función en aspectos de regulación del crecimiento en plantas es aún dudosa (Wyss-Benz y col., 1990). También se han descrito cambios en los niveles de PAs libres y cambios en la actividad y/o en la transcripción de enzimas implicadas en la ruta biosintética (arginina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa y s-adenosilmetionina descarboxilasa) por tratamientos con jasmonatos (Lee y col., 1996; Ismanishi, 1998; Mader, 1999; Biondi y col., 2000).

Biondi y col. (2001) estudiaron los niveles de PAs libres y conjugadas en explantes de tabaco tratados con diferentes dosis de metil jasmonato. Comprobaron que los niveles de PAs libres disminuían en los explantes tratados respecto del control y con respecto a las conjugadas aunque, como se ha mencionado, aumentaban por el efecto del cultivo *in vitro*. El incremento era mucho mayor en los explantes tratados que en los controles. La Spd ligada se incrementaba en presencia de metil jasmonato. La actividad enzimática tanto de las enzimas implicadas en la síntesis de Put como en las implicadas en la síntesis de Spd y Spm era mayor en explantes tratados con metil jasmonato. Shoji y col. (2000) estudiaron raíces de *Nicotiana sylvestris* y determinaron que los jasmonatos eran capaces de regular la expresión de genes de N-metil-transferasas (enzimas encargadas de metilar la Put e introducirla en la ruta de síntesis de ácido nicotínico). Los ácidos nicotínicos sintetizados a partir de Put funcionan como defensa en especies de *Nicotiana*.

1.4.4. Poliaminas y estrés.

En las plantas superiores el metabolismo de PAs es sensible a las condiciones externas (Smith, 1985). Las PAs están implicadas en las interacciones patógeno-planta (Martín-Tanguy, 1985). Los cambios más drásticos en los niveles de PAs en plantas son debidos a fenómenos de estrés abiótico (Flores, 1990) Se han encontrado variaciones frente a

deficiencias nutricionales (Houman y col., 1991), pH ácido (Young y Galston, 1983), estrés osmótico (Azíz y Larher, 1995), estrés salino (Santa Cruz y col., 1997) entre otros. También pueden prevenir el estrés oxidativo actuando como captadoras de radicales libres, tanto directa como indirectamente conjugándose con el ácido ferrúlico o caféico (Ye y col., 1997).

La mayor parte de los estudios realizados sobre estas moléculas se han referido a la fracción libre. Hay sin embargo un efecto importante, como ya se ha mencionado, de las fracciones conjugada y ligada de PAs, por ejemplo en el desarrollo de flores (Evans y Malmberg, 1989; Kaur-Sawhney y Applewhite, 1993) porque se establecen equilibrios entre las formas libres y conjugadas de PAs que determinan los niveles de PAs libres en la planta durante los procesos morfogénicos (Torrighiani y col., 1989). Piqueras y col. (2001) estudiaron la variación en los niveles de varias PAs libres y conjugadas en hojas hiperhidratadas y no hiperhidratadas de clavel observando que asociada la reversión de la hiperhidratación de las hojas había una conjugación de las PAs (disminuían drásticamente las PAs libres y aumentaban las conjugadas).

1.5. MANIPULACIÓN GENÉTICA.

1.5.1. Introducción

Los programas convencionales de mejora vegetal han permitido incrementar las tasas de producción y rendimiento en muchos de los cultivos de amplia utilización mundial durante cientos de años. Actualmente esta alternativa en muchos casos no es tan eficiente debido a la erosión genética, que se pone de manifiesto en la esterilidad de muchas de las especies tradicionalmente cultivadas, y a la consiguiente carencia de fuentes de variabilidad genética.

La manipulación genética de plantas mediante tecnologías *in vitro* ofrece una alternativa a los sistemas tradicionales de mejora de cultivos ya que representa una nueva vía para transferir genes de importancia agrícola a las plantas cultivadas.

Con el desarrollo en las últimas décadas de los métodos de ingeniería genética muchas especies vegetales, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, pueden ser transformadas con genes aislados de fuentes muy diferentes. Estos métodos pueden complementar los sistemas convencionales de cruzamiento, favorecer la variabilidad genética y modificar las propiedades o el comportamiento de las plantas en relación con una característica de interés, a través de la introducción de nuevos genes que no podrían transferirse por sistemas convencionales de mejora. Un solo gen (responsable de una característica deseable) puede ser introducido, sin que se alteren sus demás características (Henry, 1997). La introducción e integración estable de un gen extraño en el genoma de la planta le confiere una nueva característica de interés (mejor calidad de frutos, tolerancia a enfermedades, plagas y condiciones ambientales adversas, color deseado en una flor, etc.) (Birch, 1997). Con las técnicas disponibles actualmente, solo es posible introducir (e integrar en forma estable) uno o pocos genes de interés (Galun y Breiman, 1997). Si bien en el futuro es posible que se puedan introducir rutas metabólicas completas (Fernández y Gómez-Gómez, 2002).

La transformación genética unida al desarrollo de protocolos de regeneración *in vitro* de plantas conforman una de las herramientas básicas de la biotecnología. Pueden transformarse regiones meristemáticas o cualquier parte de la planta que sea capaz de regenerar un individuo completo. Es muy frecuente en este campo la transformación de embriones y suspensiones embriogénicas, puesto que se trata de tejidos capaces de originar

una plántula completa transformada. Una vez seleccionados los genes de interés las vías de transformación son variadas y han reportado rendimientos diferentes según la especie a transformar. En general, las estrategias de transformación genética de plantas se han agrupado en dos: la transformación mediada por vectores vivos (*Agrobacterium*) y la transferencia directa de genes.

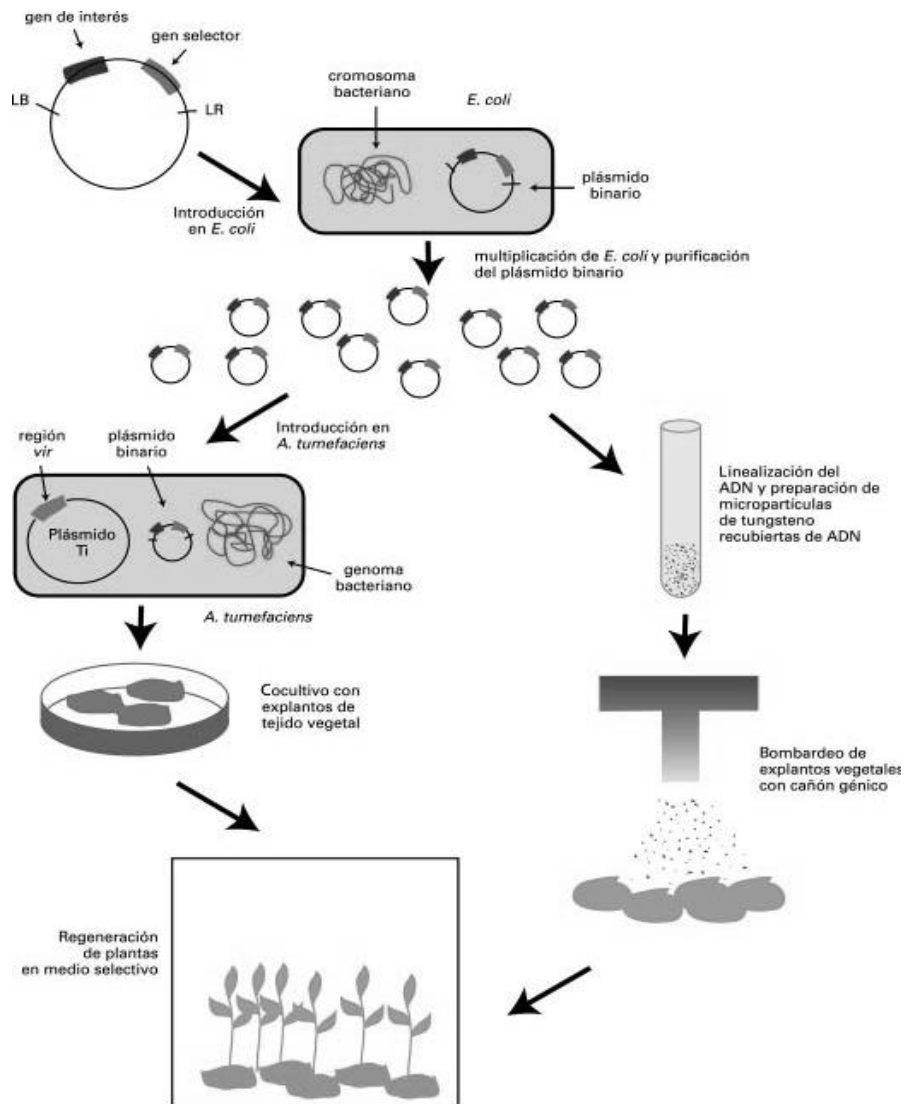


Figura 11. Esquema explicativo de dos procedimientos básicos de transformación genética en plantas.

1.5.2. Naturaleza del explante y condiciones de cultivo

Las células receptoras del ADN extraño tanto en biolística como en transformación con *Agrobacterium* deben encontrarse en un momento celular adecuado, es decir, en crecimiento activo y con la máxima capacidad para aceptar el ADN. En células de trigo, por ejemplo, se ha encontrado la máxima capacidad de transformación en las primeras fases de crecimiento, en fase logarítmica (Vansil y col., 1991). En algunas especies el tratamiento de los explantes previo a la transformación resulta efectivo, pretratamiento osmótico en especies como maíz, mandioca y trigo (Vain y col., 1993; Schöpke y col., 1997, Rasco- Gaunt y col., 1999) aunque en *Lilium longiflorum* por ejemplo no se apreció efecto positivo del pretratamiento osmótico (Watad y col., 1998). Pretratamientos con elevados niveles de auxinas en *Populus* (Han y col., 2000) y pretratamientos con acetosiringona en *Arabidopsis* (Sheikholeslam y Weeks, 1987) o en soja (Owens y Smigocki, 1988). También un tratamiento posterior a la transformación, cultivo en oscuridad y en ocasiones con medios especiales de regeneración para asegurar la activación del ciclo celular. En general las condiciones de cultivo previas y posteriores a la transformación condicionan la respuesta de muy diferentes formas en distintas especies.

1.5.3. Regeneración de plantas completas

Una vez transformado el tejido debemos lograr la regeneración de plantas completas, en este punto es muy importante el explante seleccionado para la transformación y el tipo de transformación empleada. Se seleccionaran tejidos como semillas, embriones, meristemas, etc, tejidos con capacidad regenerativa alta. El método más fiable a la hora de lograr una planta transformada es la transformación mediada por *Agrobacterium*. Pese a ello, en los casos en los que debemos emplear la biolística el resultado mejorara conforme disminuya el tamaño del explante (así se evitan quimeras con regiones transformadas y no transformadas), por ello el explante ideal son suspensiones embriogénicas o en general grupos pequeños de células.

1.5.4. Manipulación genética de plantas con bulbos y cormos

Las plantas con bulbos y cormos han sido generalmente muy reticentes a las técnicas de manipulación genética. La causa principal ha sido la transformación mediada por *Agrobacterium*, esta bacteria infecta de manera natural a plantas dicotiledóneas, con

dificultad a monocotiledóneas y con aún mayor dificultad a bulbosas y cormosas. Con la aparición de las técnicas de transferencia directa de genes mediante biolística comenzaron los progresos en la transformación de plantas con bulbos y cormos. Kamo y col. (1995) transforman gladiolo, Watad y col. (1998) *Lilium longiflorum*.

El problema de la transformación por biolística de estas especies es que por lo general se trata de transformación transitoria y el ADN foráneo no se integra en el genoma. Posteriores intentos de transformación llevaron al desarrollo una técnica combinada de bombardeo e infección mediada por *Agrobacterium*, se trata del bombardeo de *A. tumefaciens* con el gen de interés integrado en su plásmido Ti mediante biolística. Las heridas provocadas en el tejido por las partículas de oro o tungsteno facilitan la infección con *Agrobacterium*. Babu y Charla (2000) transformaron gladiolo por esta técnica.



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A la vista de lo expuesto en la introducción y conocido el estado del cultivo de azafrán en nuestro país se hace necesario un estudio exhaustivo de las características de la planta para su aplicación en la micropropagación de cormos y regeneración de plantas a partir de embriones somáticos. Algunos de los estudios más relevantes realizados hasta el momento en cultivo *in vitro* de azafrán se resumen en la Figura 12.

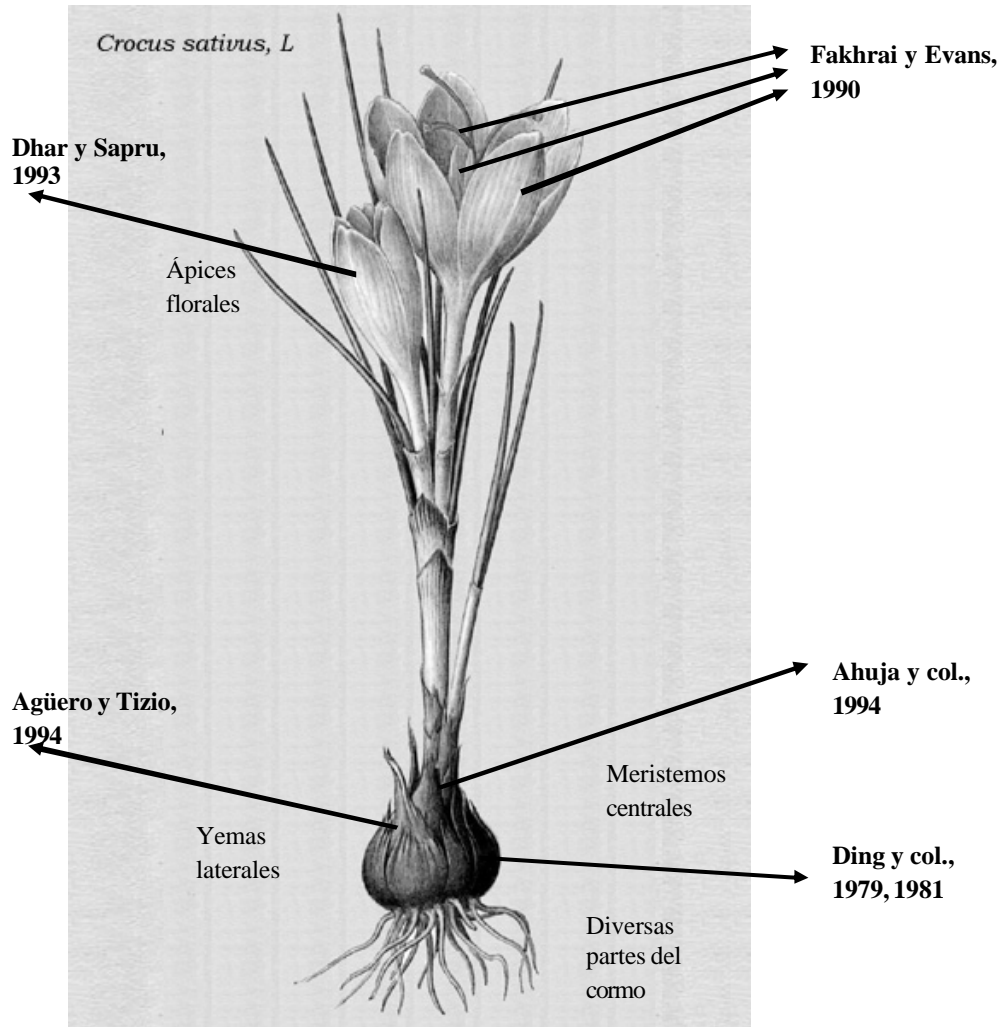


Figura 12. Partes de la planta de azafrán empleadas en cultivo *in vitro*

Dado que los estudios realizados hasta el momento han sido más bien superficiales en este trabajo se ha profundizado en otros aspectos. En primer lugar el estudio histológico nos permite realizar una clara diferenciación entre los diferentes estadios o fases de desarrollo de los embriones hasta su maduración. Una vez establecidos los estadios podemos caracterizar cada uno de ellos en función de los niveles de peroxidación lipídica, actividades antioxidantes, niveles de poliaminas libres y conjugadas, así conocemos en parte el nivel de estrés y el estado metabólico de los embriones. Por último la transformación genética de embriones inmaduros y su diferenciación a plantas maduras se plantea como el máximo aprovechamiento biotecnológico del azafrán. Además el conocimiento de la planta permitirá la optimización de la producción de embriones, plantas e incluso especies por técnicas de cultivo *in vitro*.

Los objetivos concretos de este trabajo pueden resumirse en:

1. Optimización del proceso de embriogénesis en callos de azafrán, establecimiento de una secuencia de regeneración de plantas mediante embriogénesis somática.
2. Estudio de sistemas alternativos de cultivo para la generación de material en grandes cantidades.
3. Caracterización estructural (histológica y morfológica) de las fases de desarrollo de los embriones somáticos en azafrán.
4. Estudio bioquímico de las diferentes fases de desarrollo de los embriones, caracterización de actividades antioxidantes y grado de peroxidación lipídica y relación con el proceso de embriogénesis y diferenciación de los embriones.
5. Análisis de las diferentes fracciones de poliaminas en los estadios de desarrollo de los embriones y relación de estas con el proceso embriogénico, grado de madurez de los embriones en cada estadio y situaciones de estrés provocadas por el cultivo en sistemas *in vitro*.
6. Primeros ensayos en sistemas tradicionales de transformación en plantas, etapas previas al desarrollo de un protocolo de transformación genética en azafrán.



2. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

A lo largo del desarrollo del trabajo se obtuvo una nueva línea de callos de azafrán procedentes de porciones del tronco meristemático del cormo de azafrán de “La Mancha”. Los cormos se cultivaron en el campo de prácticas de la ETSIA de Albacete, situado en carretera de Las Peñas Km 3.200.

La otra parte del material empleado en el presente trabajo se obtuvo de una línea de callos de azafrán que se mantenía en cultivo en el Laboratorio de Biotecnología del IDR desde hace ocho años (Piqueras y col., 1995). Los callos se obtuvieron a partir de porciones del tronco meristemático de cormos de azafrán de “La Mancha”, facilitados así mismo por la ETSIA de Albacete.

En todo caso se seleccionaron cormos de un tamaño mediano (10-20 gramos de peso) en buen estado fitopatológico.

2.1 DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AZAFRÁN.

2.1.0. Obtención de callos embriogénicos

2.1.0.1. Selección del explante

Se escogieron cormos sanos recogidos del campo durante el mes de Octubre, estos cormos se lavaron primeramente con agua y jabón durante 30 minutos, frotando con un cepillo, para eliminar todos los restos de tierra, capas externas del cormo y contaminantes superficiales. Después se dejaron en agua corriente durante otros 30 minutos y se esterilizaron con un fungicida de amplio espectro, en este caso se empleó cloruro de mercurio al 0,15% durante 4 minutos.

A partir de aquí se trabajó en esterilidad en cámara de flujo, tres lavados de 5 minutos con agua estéril, 4 minutos en etanol 70%, 2 lavados de 5 minutos en agua estéril, 30 minutos en solución de lejía al 20% y por ultimo al menos 6 lavados en agua estéril. Todos estos lavados se realizaron en agitación continua para asegurar la eliminación completa de los contaminantes.

2.1.0.2. Condiciones experimentales

Se tomaron como explantes tanto troncos meristemáticos centrales como yemas laterales. Los explantes se colocaron en medio N (MS completo, 30 g/l sacarosa, 5,6 g/l agar, 0,5mg/l BAP y 0,1mg/l 2.4D) (Piqueras y col., 1995), se ajustó el pH $5,78 \pm 0,2$ y se autoclavó a 121°C durante 30 minutos. Posteriormente el medio se dispensó en placas Pétri de 90cm de diámetro y se dejó solidificar.

Los explantes fueron seleccionados con un tamaño estándar de 1cm x 1cm y subcultivados cada 4 semanas hasta que apareció la respuesta, se mantuvieron en oscuridad a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Las porciones de callo fueron separándose de los restos de meristemo para evitar la muerte del tejido por no poder absorber nutrientes del medio de cultivo.

Medimos la respuesta de los meristemas en diferentes épocas del año (dependiendo del estado del cormo donador del explante).

2.1.1. Experimentos en medio sólido

2.1.1.1. Multiplicación de embriones: generación de material nodular

Los estudios sobre multiplicación del material se realizaron con material la línea desarrollada por Piqueras y col. (1995) con callos embriogénicos en estadio globular, únicamente el ensayo de obtención de callos embriogénicos (apartado 2.1.0) se realizó con material nuevo. Se ensayaron diversas combinaciones de reguladores, determinándose el incremento en peso fresco y grado de diferenciación. El experimento se realizó en medio base MS completo con 5,6gr/l de agar y 30gr/l de sacarosa, con diferentes niveles de auxinas, citoquininas y ácido jasmónico (AJ) en cada caso; 20 callos por tratamiento, diez de ellos en luz y diez en oscuridad a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante cuatro semanas. En los experimentos en SIT los medios de cultivo empleados fueron similares, sin agar y en oscuridad (excepto los casos en los que se especifique lo contrario).

2.1.1.1.1. Primer ensayo de multiplicación

Los medios evaluados se relatan en la Tabla 3.

Hormonas Medio	Auxinas(mg/l)		Citoquininas (mg/l)	Otros reguladores (mg/l)
	ANA	2,4 D	BAP	Ácido Jasmónico
A	-	-	0,1	0,1
B	-	-	0,5	0,1
C	-	-	1	0,1
D	1	-	2	-
E	0,5	-	2	-
F	-	0,05	2	-
G	1	-	-	1
N	-	0,1	0,5	-

Tabla 3. Combinaciones de reguladores empleadas en los estudios de multiplicación.

ANA. Ácido naftalenacético

2,4D. Ácido 2, 4 diclorophenoxiacético

BAP. Bencilaminopurina

Se evaluó la variación en peso fresco cada siete días durante 30 días para construir curvas de crecimiento, se estudió también la respuesta morfogénica

2.1.1.1.2. Segundo ensayo de multiplicación

Un segundo estudio de multiplicación sobre este mismo material se realizó comparando la respuesta (variación en peso, crecimiento a lo largo de cuatro semanas y características de los callos) en dos medios de cultivo con MS completo, 5,6g/l agar, 30g/l sacarosa, pero usando diferentes auxinas: ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) y ácido naftalenacético (ANA):

ND1: 1mg/l BAP y 0,1mg/l 2,4D

ANA1: 1mg/l BAP y 0,05mg/l ANA.

Se estudiaron 20 explantes por tratamiento en luz y oscuridad a $25\pm 1^{\circ}$ C.

2.1.1.2. Inicio de diferenciación de embriones: optimización de las condiciones de cultivo para la formación de embriones dipolares

Una vez establecido un medio de multiplicación para los callos embriogénicos en estadio globular de azafrán se estudiaron las posibles combinaciones de reguladores que podían influir en el inicio de la diferenciación de estos embriones. Se analizó el desarrollo de estructuras monopolares con inicio de desarrollo de los polos característicos del embrión a partir de las estructuras globulares que conformaban los callos durante la multiplicación.

El experimento fue realizado en medio base (similar al empleado en los ensayos de multiplicación), con las combinaciones hormonales indicadas en las Tablas 4, 5 y 6 y diez callos por tratamiento en oscuridad durante cuatro semanas.

2.1.1.2.1. Primer ensayo de diferenciación: Ensayo BAP/TDZ

Hormonas	Otros Reguladores (mg/l)	Auxina (mg/l)	Citoquinina (mg/l)
Medio	AJ	ANA	BAP
1	0,1	0,125	0,5
2	0,1	0,125	1
3	0,1	0,125	2
4	0,1	0,25	0,5
5	0,1	0,25	1
6	0,1	0,25	2
7	0,1	0,5	0,5
8	0,1	0,5	1
9	0,1	0,5	2
10	0,1	0,75	0,5
11	0,1	0,75	1
12	0,1	0,75	2
13	0,5	0,125	0,5
14	0,5	0,125	1
15	0,5	0,125	2
16	0,5	0,25	0,5
17	0,5	0,25	1
18	0,5	0,25	2
19	0,5	0,5	0,5
20	0,5	0,5	1
21	0,5	0,5	2
22	0,5	0,75	0,5
23	0,5	0,75	1
24	0,5	0,75	2
25	1	0,125	0,5
26	1	0,125	1
27	1	0,125	2
28	1	0,25	0,5
29	1	0,25	1
30	1	0,25	2
31	1	0,5	0,5
32	1	0,5	1
33	1	0,5	2
34	1	0,75	0,5
35	1	0,75	1
36	1	0,75	2

Hormonas	Otros Reguladores (mg/l)	Auxina (mg/l)	Citoquinina (mg/l)
Medio	AJ	ANA	TDZ
1	0,1	0,125	0,25
2	0,1	0,125	0,5
3	0,1	0,125	1
4	0,1	0,25	0,25
5	0,1	0,25	0,5
6	0,1	0,25	1
7	0,1	0,5	0,25
8	0,1	0,5	0,5
9	0,1	0,5	1
10	0,1	0,75	0,25
11	0,1	0,75	0,5
12	0,1	0,75	1
13	0,1	1	0,25
14	0,1	1	0,5
15	0,1	1	1
16	0,5	0,125	0,25
17	0,5	0,125	0,5
18	0,5	0,125	1
19	0,5	0,25	0,25
20	0,5	0,25	0,5
21	0,5	0,25	1
22	0,5	0,5	0,25
23	0,5	0,5	0,5
24	0,5	0,5	1
25	0,5	0,75	0,25
26	0,5	0,75	0,5
27	0,5	0,75	1
28	0,5	1	0,25
29	0,5	1	0,5
30	0,5	1	1
31	1	0,125	0,25
32	1	0,125	0,5
33	1	0,125	1
34	1	0,25	0,25
35	1	0,25	0,5
36	1	0,25	1
37	1	0,5	0,25
38	1	0,5	0,5
39	1	0,5	1
40	1	0,75	0,25
41	1	0,75	0,5
42	1	0,75	1
43	1	1	0,25
44	1	1	0,5
45	1	1	1

TDZ. Tidiazuron

Tabla 4. Combinaciones hormonales empleadas en el primer ensayo de diferenciación BAP/TDZ.

En este ensayo se midieron dos parámetros:

- 1) Supervivencia.
- 2) Diferenciación.

Fueron considerados explantes viables aquellos que presentaban un crecimiento normal, de tipo nodular y con buen aspecto (sin oxidación, hiperhidratación, ni endurecimiento).

2.1.1.2.2. Segundo ensayo de diferenciación: efecto del AJ

Se realizó un segundo ensayo en el que se profundizó en el efecto de la combinación de BAP con ANA y AJ. Al igual que en el ensayo con BAP y TDZ, los parámetros analizados fueron la tasa de supervivencia y la tasa de diferenciación (con las consideraciones explicadas en el ensayo anterior). Se utilizó medio base y ocho explantes por tratamiento en oscuridad durante cuatro semanas. Estudiamos posteriormente el grado de maduración (diferenciación apical y diferenciación final de los embriones al cabo de ocho semanas en el mismo medio).

Las combinaciones hormonales se indican en la Tabla 5.

Hormonas	Auxina (mg/l)	Citoquinina (mg/l)	Otros reguladores (mg/l)
Medio	ANA	BAP	AJ
1	0,2	4	0
2	0,2	4	0,1
3	0,2	4	0,5
4	0,2	6	0
5	0,2	6	0,1
6	0,2	6	0,5
7	0,5	4	0
8	0,5	4	0,1
9	0,5	4	0,5
10	0,5	6	0
11	0,5	6	0,1
12	0,5	6	0,5

Tabla 5 Combinaciones hormonales empleadas en el segundo ensayo de inducción de diferenciación.

Para completar los ensayos anteriores con BAP, ANA y AJ se empleó medio base con 0,5mg/l BAP, 0,05mg/l ANA (medio ANA 1) y 0,1mg/l de jasmónico, se estudiaron 40 explantes por tratamiento en oscuridad. En este caso se midió el inicio de formación de embriones dipolares y la maduración posterior de estos embriones.

2.1.1.2.3. Tercer ensayo de inducción de embriones dipolares: Efecto de otros reguladores

Se probaron una serie de compuestos capaces de inducir procesos de brotación y morfogénesis en otras especies para constatar su efecto en nuestro material de estudio. Los cultivos fueron realizados en medio base (MS completo, 30g/l sacarosa y 5,6g/l agar), con diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas y seis explantes por tratamiento en oscuridad a $25\pm 1^\circ\text{C}$. Fueron evaluados, el incremento en peso en cuatro semanas y la inducción de polaridad en cuatro y ocho semanas de tratamiento.

Compuesto	Concentración (μM)				Combinación auxina /citoquinina	
TIBA	0,1	0,5		50	ND1(0.1mg/l 2,4D, 1mg/lBAP)	
NPA	0,1	0,5		50	ND1	“
AVG	0,1	0,5	5	50	ND1	“
BITC	0,1	0,5	5	50	ND1	“
H₂O₂	50	100	200	400	ND1	“
Ácido Salicílico	100	500	1000	5000	ANA1(0.05mg/lANA, 1mg/lBAP)	
Cloruro de Cobalto	0,1	1	10	100	ANA1	“
Putrescina	0,1	0,5	5	25	ANA1	“
Tiosulfato de Plata	0,6	3	15	75	ANA1	“
Phloroglucinol	100	1000	2500	5000	ANA1	“

Tabla 6. Concentraciones empleadas de cada uno de los diferentes compuestos y medio de multiplicación con el que se combinan.

TIBA. Ácido 2, 3, 5 triiodobenzoico (antiauxina)
NPA. Ácido 1-naptiltalámico (antiauxina)
AVG. Aminoetoxivinilglicina (inhibidor de etileno)
BITC. Bencilisotiocianato (inhibidor de etileno)

Medios: **ND1.** 0,1mg/l 2,4D y 1mg/l BAP
ANA1. 0,05mg/l ANA y 1mg/l BAP

2.1.1.3. Diferenciación de los embriones dipolares y formación de plántulas

En la última fase del desarrollo de los embriones tenía lugar la formación y desarrollo del cormo, brotes, hojas y en algunos casos raíces.

2.1.1.3.1. Primer ensayo: efecto del AJ en la formación del cormo.

En un primer ensayo se determinaron los niveles de ácido jasmónico óptimos para inducir el desarrollo del cormo, en combinación con un aumento en la concentración de sacarosa y MS a media fuerza (1/2 MS).

El material de partida fueron embriones con desarrollo parcial del polo apical, en los que no se apreciaba todavía modificación basal. Fueron estudiados 25 explantes por tratamiento. Los cultivos se mantuvieron cuatro semanas en oscuridad a 25°C. Se midió el número de explantes con respuesta positiva (desarrollo de cormos).

Los medios empleados se presentan en la Tabla 7.

	Citoquinina	Otros Reguladores	Medio Base	Fuente carbono
Medio	BAP	Ácido Jasmónico	MS	
Control	1mg/l	0 mg/l	1/2	50g/l
1	1mg/l	0,3mg/l	1/2	50g/l
2	1mg/l	0,5mg/l	1/2	50g/l
3	1mg/l	1mg/l	1/2	50g/l

Tabla 7. Combinaciones de ácido jasmónico ensayadas en formación del cormo.

Para profundizar en esta respuesta se llevo a cabo un segundo experimento en el que se compararon los medios 2 y 3 del ensayo anterior. Las condiciones de cultivo fueron las mismas, analizándose en este caso solo 10 explantes por tratamiento. Los parámetros estudiados fueron:

- Variación en peso.
- Diferenciación
- Longitud de los brotes (variaciones en los brotes preexistentes y longitud de los brotes nuevos), en todo caso solo se consideraron incrementos superiores a 0,1cm.

Una vez establecido 0,5mg/l de AJ como concentración óptima se ensayó una nueva combinación, ½ MS + 40g/l de sacarosa + 0,25mg/l de BAP y 0,5mg/l de AJ, en explantes procedentes de medio ND1 denominado medio de maduración 1 (MAD1). Se observaron 24 explantes en los que se caracterizó el tipo de respuesta dividiendo el desarrollo en:

- a) Engrosamiento en la base del brote.
- b) Cormo pequeño.
- c) Cormo pequeño con brote.
- d) Cormo grueso.
- e) Cormo grueso con brote.
- f) Explantes sin respuesta.

La respuesta fue cuantificada al cabo de 15 y 30 días de cultivo.

Dado que, en muchos de los casos, las diferencias en la respuesta de los explantes fueron debidas a una falta de sincronía en el desarrollo de los embriones, se diseñó un nuevo experimento para conocer el efecto del AJ en función del momento del desarrollo en el que se encontrara el embrión.

Fueron establecidos dos grupos dentro de los embriones dipolares:

- FI, embriones con brotes inmaduros.
- FF, embriones con brotes más maduros pero sin modificación en la base del brote.

Fueron cultivados en el medio 3 ($\frac{1}{2}$ MS + 50g/l sacarosa + 1mg/l BAP + 1mg/l AJ), 30 explantes por tratamiento (AJ y control), 15 en cada grupo.

2.1.1.3.2. Segundo ensayo: efecto combinado AJ/ Sacarosa

El ácido jasmónico interviene en los procesos de formación del cormo y parece estar relacionado con el metabolismo de carbohidratos (Zel y col., 1997). Para dilucidar la relación entre la concentración de fuente de carbono y el ácido jasmónico en la maduración del embrión en azafrán se diseñó un último experimento con AJ.

Este experimento consistió en combinaciones de tratamientos durante ocho semanas, cuatro semanas por tratamiento, con 20 explantes por combinación en oscuridad a 25°C, usando material procedente de medio ND2 (medio base, 0,1mg/l 2,4D, 2mg/l BAP).

Tratamiento 1

Semanas 1-4 MSc + 30g/l sacarosa + 2mg/l BAP + 0,1mg/l 2,4D + 1mg/l AJ

Semanas 4-8 MSc + 40g/l sacarosa + 2mg/l BAP + 0,1mg/l 2,4D + 0,5mg/l AJ

Tratamiento 2

Semanas 1-4 MSc + 40g/l sacarosa + 2mg/l BAP + 0,1mg/l 2,4D

Semanas 4-8 MSc + 50g/l sacarosa + 2mg/l BAP + 0,1mg/l 2,4D + 1mg/l AJ

Semanas 1-4: el desarrollo de los explantes se midió clasificándolos en varios grupos al igual que en el ensayo anterior:

- a) explantes no desarrollados o con desarrollo lento (embriones en estadio dipolar inicial)
- b) embriones más desarrollados, con modificación basal
- c) estructuras b) pero con brotes mas desarrollados
- d) estructuras c) con brotes verdes
- e) plántulas totalmente formadas

La respuesta se midió a los 15 y a los 30 días.

Semanas 4-8, se midieron las variaciones en peso, longitud del brote y grosor del cormo a los 15 y a los 30 días de cultivo. En los casos en los que el número de brotes o cormos que se iniciaban era mayor de uno, los valores de cada explante se calcularon sumando todos sus brotes.

En un último ensayo con AJ sobre material dipolar se empleo material procedente de dos situaciones diferentes:

- Embriones dipolares procedentes de tratamiento con 0,05mg/l de ANA, 1mg/l de BAP y 40g/ de sacarosa.
- Embriones dipolares procedentes de un tratamiento similar pero con 1mg/l de AJ.

Los tratamientos empleados se resumen en la Tabla 8

Medio	MS	Sacarosa (g/l)	Reguladores (mg/l)	
			BAP	AJ
1	C	40	1	0.5
2	C	40	1	1
3	½	40	10	5
4	½	40	1	1

Tabla 8.

Seis explantes por tratamiento en oscuridad durante cuatro semanas.

2.1.1.3.3. Tercer ensayo: efecto del GA₃ en la maduración del cormo

Constituyó el último paso en el proceso de diferenciación, es decir, la maduración completa de los embriones. Para mejorar el rendimiento de este proceso se seleccionó material procedente de MAD 1 ($\frac{1}{2}$ MS + 40g/l de sacarosa, 0,25mg/l de BAP y 0,5mg/l de AJ), añadiendo ácido giberélico (GA₃) al medio de cultivo. Se probaron cuatro niveles de GA₃ retirando el resto de hormonas, en luz y en oscuridad, con seis réplicas por tratamiento.

Los medios empleados fueron:

Crecimiento (C): MS completo + 40g/l sacarosa

-C1: C + 0,025mg/l de GA₃

-C2: C + 0,1mg/l de GA₃.

-C3: C + 0,5mg/l de GA₃.

-C4: C + 1mg/l de GA₃.

Solo fueron empleadas dos réplicas por tratamiento, dado que la formación de cormos es un proceso muy lento, y los embriones dipolares con un nivel de desarrollo adecuado (modificación basal) no eran muy abundantes.

Se midieron los incrementos en peso, número de brotes, longitud de los brotes y grosor de los embriones con cormo desarrollado a las dos y a las cuatro semanas de tratamiento.

Este mismo ensayo se realizó sobre material procedente de:

$\frac{1}{2}$ MS, 40g/l de sacarosa, 2mg/l de BAP, 0,1mg/l de 2,4D y 1mg/l de AJ.

$\frac{1}{2}$ MS, 50g/l de sacarosa, 2mg/l de BAP, 0,1mg/l de 2,4D y 1mg/l de AJ.

Dos explantes por tratamiento, solo en luz.

Se observó la presencia de plántulas al final del tratamiento de plántulas.

2.1.2. Experimentos con sistemas de inmersión temporal (SIT)

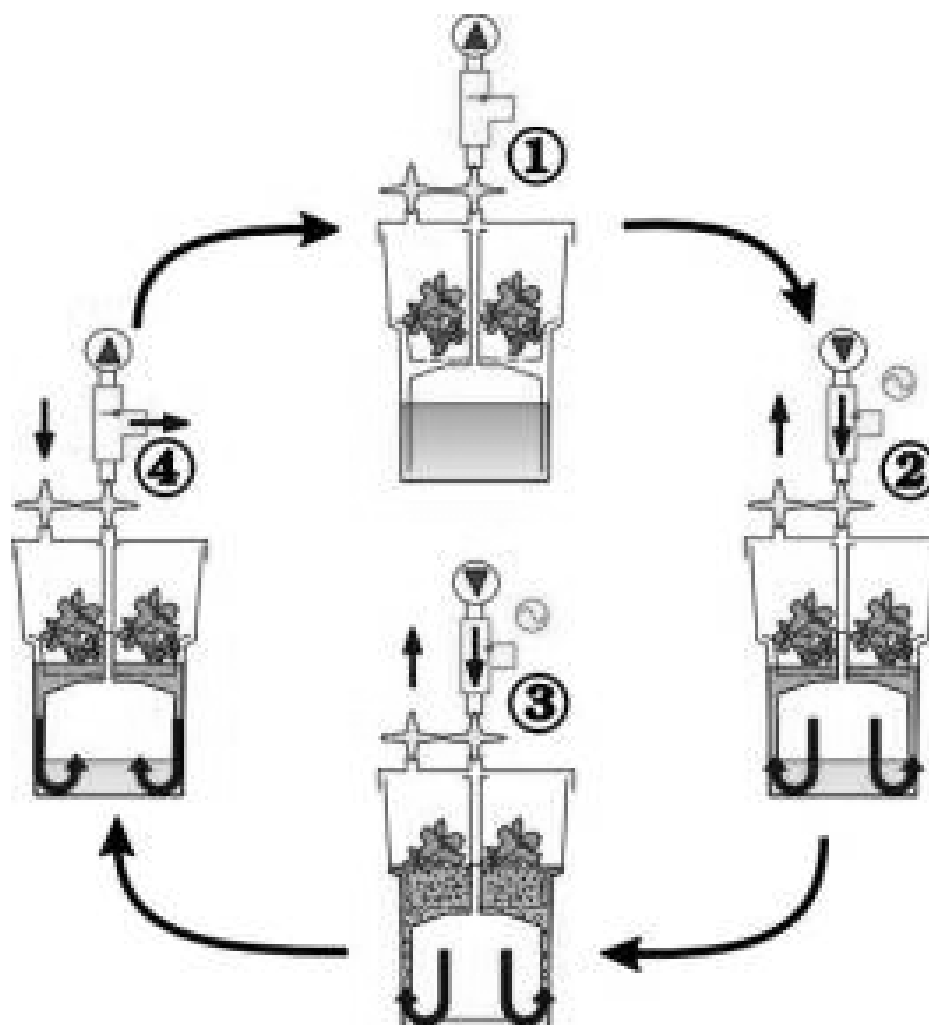
2.1.2.1. Descripción del funcionamiento básico de los sistemas

El sistema se compone de un contenedor con dos apartados, uno para el medio de cultivo y otro para el material vegetal (comunicados por un conducto). El medio de cultivo pasa de un espacio a otro mediante el impulso de una bomba peristáltica de flujo reversible que al introducir aire en el contenedor provoca la salida del medio por presión hacia el contenedor donde se encuentra el material vegetal. Así se mantiene el material en cultivo sumergido a intervalos de tiempo controlados en el medio. Estos sistemas se mantienen en esterilidad gracias a los filtros que se colocan en las entradas y salidas de aire (Etienne y col., 2002). El funcionamiento básico de este tipo de sistemas se muestra en la Figura 13.

Se realizaron varios estudios preliminares para establecer el tiempo de inmersión, cantidad inicial de material y cantidad de medio de cultivo acorde con el material empleado por recipiente. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

- Fase sumergida: Un total de dos horas al día repartidos en ocho inmersiones de 15 minutos cada una.
- Explante: Ocho gramos por recipiente se usaron como explante inicial
- Medio de cultivo: 250ml por recipiente, se subcultivaron cada cuatro semanas.

El medio de cultivo es similar a los empleados en medio sólido pero sin agar, además se añaden, según ensayo, compuestos como el PAC o la PVP para evitar la hiperhidratación de los tejidos.



1. Fase estacionaria.
2. Entrada de aire que provoca la subida del medio de cultivo al compartimento superior.
3. Fase sumergida.
4. Deja de entrar aire por lo que el medio desciende de nuevo del compartimento superior al inferior.

Figura 13. Esquema básico de funcionamiento de los SIT.

Se emplearon dos tipos de sistemas:

- 1) Sistemas de filtros adaptados para la inmersión temporal.
- 2) Sistemas de Inmersión Temporal propiamente dichos, RITA's.

Los ensayos se realizaron indistintamente en los dos tipos de sistemas.

2.1.2.2. Medios para la optimización de la proliferación.

En un primer ensayo se testaron varios compuestos para reducir la hiperhidratación del material en el paso de medio sólido a medio líquido y la liberación de compuestos fenólicos, ácido ascórbico, paclobutrazol (PAC) y polivinilpirrolidona (PVP). Estos compuestos se combinan con medio MS completo y con ½ MS y en todos los casos con las concentraciones de auxinas y citoquininas del medio N (0,5mg/l BAP y 0,1mg/l 2,4D). Las combinaciones empleadas se detallan en la Tabla 9.

Los parámetros medidos en este caso fueron aumento en peso fresco al cabo de cuatro semanas y aspecto (oxidación e hiperhidratación del tejido).

Los sistemas se mantuvieron en oscuridad y a una temperatura de 20±5°C en todos los ensayos.

Medio Base	Auxina (mg/l) 2,4D	Citoquinina (mg/l) BAP	Otros compuestos (mg/l)		
			Ábscórbito (mg/l)	PVP (mg/l)	Paclobutrazol (mg/l)
½ MS	0,1	0,5	200	-	-
½ MS	0,1	0,5	-	500	-
½ MS	0,1	0,5	-	-	5
MSc	0,1	0,5	200	-	-
MSc	0,1	0,5	-	500	-
MSc	0,1	0,5	-	-	5

Tabla 9. Ensayo con MS y ½ MS de compuestos para mejorar el crecimiento en medio líquido de los explantes.

2.1.2.3. Generación de material en E1

Se realizaron ensayos hormonales, con 2,4 D y ANA (cambio en el tipo de auxina). Cada uno de estos ensayos se llevó a cabo con controles pero con una única réplica por tratamiento.

Se midió incremento en peso fresco y se valoró el aspecto del material.

Medio Base	Auxina (mg/l)		Citoquinina (mg/l) BAP
	2,4D	ANA	
1 MSc+pvp	0,1	-	0,5
2 MSc+pvp	0,1	-	2
3 MSc+pvp	-	0,1	2

Tabla 10. Combinaciones hormonales ensayadas para multiplicación en SIT.

2.1.2.4 Estadío dipolar

2.1.2.4.1 Inducción de embriones dipolares

En un primer ensayo de los explantes en este tipo de sistemas se probaron varias concentraciones de BAP en combinación con ½ MS para estudiar el efecto en el desarrollo de los embriones. Se empleó en todos los casos, ½ MS, 30g/l sacarosa y 0.5g/l PVP. Las combinaciones hormonales ensayadas fueron:

1. 2mg/l BAP + 0,05mg/l ANA
2. 2mg/l BAP + 0,1 mg/l 2,4D
3. 4mg/l BAP + 0,1 mg/l 2,4D

De este ensayo se seleccionó el medio 2 y con este medio se realizó el siguiente ensayo que consistió en determinar el efecto del ácido jasmónico a este nivel, empleando los medios:

- Crecimiento:** MS completo+ 30g/l sacarosa + 0,5g/l PVP
Control: Crecimiento + 2mg/l BAP + 0,1 mg/l 2,4D
1. Crecimiento + 2mg/l BAP + 0,1 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l AJ

2.1.2.4.2. Ensayo con diferentes fuentes de carbono

Se realizaron una serie de tratamientos con varias fuentes de carbono en diferentes concentraciones para comprobar su efecto sobre la inducción del estadío 2 en los callos en sistemas de inmersión temporal, en medio ANA1, dos réplicas por tratamiento, para profundizar en estos efectos. Los tratamientos ensayados se relatan en la Tabla 11.

Medio Base	Hormonas (mg/l)		Fuente de carbono
	BAP	ANA	
MSc	1	0,05	Glucosa 2%
MSc	1	0,05	Glucosa 4%
MSc	1	0,05	Sorbitol 2%
MSc	1	0,05	Sorbitol 4%
MSc	1	0,05	Galactosa 4%
MSc	1	0,05	Sacarosa 2%
MSc	1	0,05	Sacarosa 3% (control)

Tabla 11. Diferentes fuentes de carbono empleadas en SIT.

2.2 MORFOLOGÍA DEL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AZAFRÁN.

2.2.1. Caracterización del material

Como consecuencia de los datos experimentales obtenidos en el apartado de desarrollo de un protocolo de embriogénesis somática en azafrán fueron diferenciados cuatro estadios fisiológicos de desarrollo de los embriones. Desde la formación de los nódulos embriogénicos (embriones somáticos), a partir del meristemo, hasta que se completaba la formación de una plántula con cormo, independiente de la masa de callo. En el presente apartado de estructura se realizó una caracterización morfológica de los diferentes estadios que pueden diferenciarse en el proceso de embriogénesis somática en azafrán.

En el inicio el material se encontraba en estadio 0, estadio proglobular. A partir de las regiones más activas del meristemo se iban formando nódulos embriogénicos. Los nódulos embriogénicos evolucionaron hacia estructuras globulares que conformaban el estadio I, estadio globular. Comenzó a diferenciarse el polo apical en forma de brotes, entonces cada uno de estos nódulos globulares pasaba a estadio II, estadio monopolar.

La siguiente fase de diferenciación se inició con el establecimiento de la polaridad en los embriones en estadio I. En primer lugar se apreciaba claramente la diferenciación del polo apical con la formación de un único cotiledón. En este momento los embriones se clasificaron como estadio II (monopolar). El desarrollo del cotiledón continuó mientras tenía lugar el engrosamiento basal, que generaba un incipiente cormo basal precursor del polo radicular (embriones en estadio III, dipolar). Una vez que el embrión somático presentaba una clara diferenciación de su polaridad conformando una plántula independiente del callo se clasificó como estadio IV. Los embriones en estadio IV o plántulas se componían de un meristemo apical diferenciado en hojas y una zona cormogénica basal precursora del polo radicular (Figura 14).

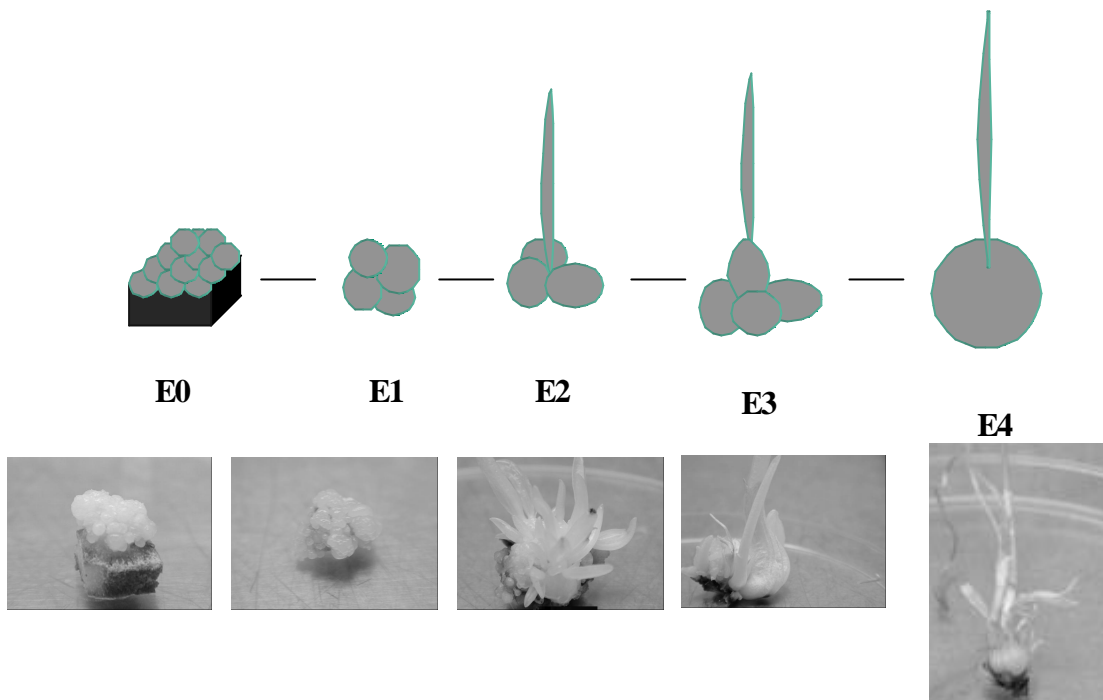


Figura 14. Fases o estadíos en los que se divide el desarrollo de los embriones somáticos de azafrán

2.2.2. Microscopia.

El trabajo de microscopía se realizó en el CEBAS-CSIC (Murcia).

Para el estudio microscópico del material tomaron secciones de aproximadamente un centímetro de embriones en cada uno de los cuatro estadíos descritos anteriormente.

2.2.2.1. Preparación de las muestras para microscopia óptica

El material se lavó en tampón cacodilato 0,1M pH 7,2 durante 15 minutos y se fijó con una solución en fresco de glutaraldehído 2,5% y paraformaldehído 4% en tampón cacodilato 0,1M pH 7,2. Para asegurar una mejor fijación se trataron las muestras en vacío suave durante 25 minutos, la fijación de estructuras se completó dejando el material en la solución entre 2 y 2,5 horas a 4°C.

Tras la fijación el material se deshidrató en dosis crecientes de acetona. El material deshidratado se incluyó en LKB historesina (Yeung y col., 1987) y se cortó con un microtomo de rotación dándole a las secciones un grosor de 5 y 10µm. Los cortes

seriados se colocaron en un portaobjetos cubierto con un adhesivo (Pappas, 1971) y se secaron en una placa calefactora.

Previamente a la tinción se eliminó la resina y se tiñó con azul de toluidina. Se sumergieron las muestras en una mezcla que contenía 7,1g/l de hidrógeno fosfato disódico, 4,8g/l de ácido cítrico y 0,25g/l de azul de toluidina, durante 30 segundos, lavándose posteriormente 2 o 3 veces con agua destilada. Estas muestras teñidas se dejaron secar y se cubrieron con un cubreobjetos con medio de montaje (Bálsamo de Canada). Para su visualización se empleó un microscopio óptico invertido, Nikon eclipse TE 300.

2.2.2.2. Preparación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión

El material se fijó en una solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% en tampón fosfato sódico 0,1M a pH 7,2 durante dos horas y media a 4°C previamente infiltradas al vacío. Posteriormente se efectuaron tres lavados de 15min cada uno de las muestras en el mismo tampón fosfato sódico y fueron postfijadas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% en tampón fosfato sódico 0,1M a pH 7,2 durante dos horas. Tras la fijación se lavaron las muestras en el mismo tampón dos veces durante 15min y se dejaron durante toda la noche en un tercer lavado. Las muestras se deshidrataron en una serie de alcoholes de concentraciones crecientes (etanol 35%, 50%, 75%, 96% y absoluto), manteniéndose en cada concentración 45min.

Las muestras se incluyeron posteriormente, se sumergieron en óxido de propileno durante 30 min, dos veces, en óxido de propileno con resina Spurr (1:1) durante una hora y finalmente en resina Spurr 24 horas.

La última fase es la solidificación, las muestras se colocaron en moldes pretallados (Sigma) y rellenados con resina Spurr (Spurr, 1969), posteriormente se colocaron en estufa a 68°C durante un mínimo de 16 horas. Una vez obtenidos los bloques se tallaron y se realizaron los cortes con un ultramicrotomo Leica. Los cortes fueron montados en rejillas de cobre y contrastados con citrato de plomo.

Finalmente las secciones se observaron con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10.

2.2.2. 3. Preparación de las muestras para microscopía electrónica de barrido

El material se prefijó en glutaraldehído al 4% en tampón fosfato 50mM pH 7 durante tres horas. El exceso de glutaraldehído tras la prefijación se eliminó con sucesivos lavados con tampón fosfato. Posteriormente se deshidrataron mediante una serie creciente de acetonas (desde acetona 30% hasta acetona 100%).

El material deshidratado se secó en punto crítico con un Bases Unión CT20 (procedimiento en el que el material se mantiene en una atmósfera de CO₂ con la presión y temperatura necesarias para mantener el CO₂ en estado líquido, así extraemos los restos de agua que quedan en el tejido).

Para su conservación y visualización se recubrieron las muestras de partículas de oro. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6100.

2.3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES EN LOS DIFERENTES ESTADÍOS DE DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE AZAFRÁN

La determinación de las actividades antioxidantes se realizó en el CEBAS-CSIC (Murcia).

Para el estudio de las actividades enzimáticas se seleccionaron muestras de tejidos de los diferentes estadios de embriogénesis somática.

2.3.1. Condiciones de crecimiento del material vegetal

Los embriones se indujeron en medio MS completo, 3% sacarosa y 0.6% agar. La combinación de reguladores empleada en la inducción fue 0,5mg/l de BAP y 0,1mg/l de 2,4D. Posteriormente se sustituyó el 2,4D por 0,05mg/l de ANA y en los estadios finales de desarrollo (E4) se añadió al medio de cultivo 0,5mg/l de AJ e incrementos en la concentración de sacarosa (como se explicó en el apartado 2.1).

2.3.2. Extracciones enzimáticas

Todas las extracciones de actividades enzimáticas fueron realizadas a 4°C. Para los extractos se homogeneizó un gramo de peso fresco de tejido en cada uno de los estadios de desarrollo analizados en un mortero con 2ml del tampón de extracción. El tampón de extracción estaba compuesto por: tampón fosfato potásico 50mM pH 7,8, EDTA 0,1mM con cisteína 5mM, PVP 1%, PMSF 0,1mM y tritón X-100 0,2%. Únicamente en la extracción de la ascorbato peroxidasa (APX) se incorporaron a este tampón 20mM de ascorbato, para evitar la inactivación de este enzima durante el proceso.

Los homogenizados se centrifugaron a 14.000g durante 20min y se tomó la fracción sobrenadante. Esta fracción se purificó mediante el paso por una columna de 1ml de Sephadex G-25 equilibrada con el mismo tampón empleado durante la extracción.

2.3.3. Determinación de proteínas.

Para la determinación de proteínas totales en los extractos crudos se utilizó el método de Bradford (1976). La curva patrón de albúmina de suero bovino se prepara por dilución

en el tampón de extracción a partir de una solución madre de albúmina de 80µg/ml con concentraciones de 4, 8, 16, 32, 64 y 80µg/ml de proteína.

2.3.4 Determinación de actividades antioxidantes.

2.3.4.1. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD).

Se empleó el método de citocromo c, basado en la inhibición, por parte de la SOD, de la reducción del citocromo c por los radicales libres O_2^- generados por el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa (McCord y Fridovich, 1969).

El ensayo se llevo a cabo en un volumen final de reacción de 1,5ml de una mezcla que contenía citocromo c 1mM, xantina 1mM, en tampón fosfato potásico 50mM, pH 7,8; NaEDTA 0,1mM, saturada en aire.

La reacción se efectuó en cubetas de cuarzo de 1cm de paso óptico, iniciándose la misma añadiendo una suspensión de xantina oxidasa preparada en el tampón anterior. La reducción del citocromo c se siguió por registro continuo a 550nm en un espectrofotómetro termostatzado a 25°C de doble haz UVIKON 930 (Kontron Instruments).

En primer lugar se efectuó una reacción control. Para ello, una vez ajustado el cero de del espectrofotómetro con 1,5ml de mezcla de reacción, se adicionaron distintos volúmenes de xantina oxidasa (10-15µl), hasta obtener un $\Delta E_{550}/\text{min}$ comprendido entre 0,024 y 0,026. Para la reacción problema se añadieron 10-25µl de muestra a la reacción, iniciándose esta al adicionar a la cubeta problema un volumen de xantina oxidasa previamente ajustado en la reacción control.

Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% en la velocidad inicial de reducción de citocromo c en la reacción control a 25°C (McCord y Fridovich, 1969). La actividad enzimática, en $U\text{ ml}^{-1}$, se calculó a partir del porcentaje de inhibición producido por la muestra según la expresión:

$$\% \text{Inh} = (\Delta E_{550}/\text{min}_{\text{control}} - \Delta E_{550}/\text{min}_{\text{problema}}) / \Delta E_{550}/\text{min}_{\text{control}}$$

2.3.4.1.1. Separación de las isoformas SOD en geles

La separación de las diferentes isoformas enzimáticas de la SOD se realizó por electroforésis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes empleando

un gel al 12% de archilamida, mediante un sistema de electroforesis miniprotein II. Las isoformas de SOD fueron localizadas mediante el método de Weissiger y Fridovide (1973), identificándose las isoenzimas por inhibición selectiva con KCN o Cl_2O_2 de acuerdo con Hernández (1999). El porcentaje de actividad para las diferentes isoformas se cuantificó mediante transmitancia escaneando los geles con un sistema para análisis de geles, gene tools (SYNGENE, Becon House, Niffield, Cambridge UK)

2.3.4.2. Determinación de la actividad ascorbato peroxidasa (APX)

Se empleó el método de Hernández y col. (2001). La medida de la actividad APX se realizó por medio del grado de oxidación del ácido ascórbico en un periodo entre 1 y 60 segundos tras el inicio de la reacción con la adición del H_2O_2 . Este método es fiable gracias a la escasa oxidación no enzimática del ácido ascórbico en presencia de H_2O_2 . La medida de la actividad APX se realizó en presencia y ausencia de 0,5mM de ácido p-hidroximercuribenzoico (PHMB), un inhibidor específico de APX. De esta forma las medidas de APX sensible a PHMB corresponden a APX clase I y las de APX insensible a PHMB a la APX clase III. La determinación se efectuó a 25°C en un espectrofotómetro UVIKON 930 (Kontron instruments).

2.3.4.3. Determinación de la actividad catalasa

Se utilizó el método descrito por Aebi (1984). Este método se basa en la medida del descenso en el valor de la absorbancia a 240nm ocasionado por la desaparición del peróxido de hidrógeno. La determinación se efectuó a 25°C en un espectrofotómetro similar al del ensayo anterior.

La reacción se inicia al añadir 25µl de muestra a una mezcla de reacción (2,9ml) que contenía 10mM H_2O_2 en tampón potásico 50mM pH 7,8. El registro se efectuó midiendo a 240nm frente a un blanco compuesto por agua destilada. La actividad enzimática, expresada en μM de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$, se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción y del coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 ($E=39,58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.3.4.4. Determinación de la actividad monodehidroascórbato reductasa (MDHAR)

Para su determinación se utilizó el método de Hodges y col. (1997) con algunas modificaciones. Método basado en la disminución de la absorbancia a 340nm debido a la oxidación del NADH.

El ensayo se llevó a cabo a 25°C y la mezcla de reacción en un volumen final de 1ml, conteniendo 0,65ml de tampón Tris-HCL 50mM pH 7,8; 0,05ml de triton X-100 al 1,25%; 0,1ml de NADH 0,2mM; 0,5 unidades (12,5 U) de ascorbato oxidasa; 0,1ml de ascorbato 2,5 mM y 50µl de muestra.

La reacción se inició por adición de NADH, siguiendo su oxidación durante un minuto frente a un blanco de muestra, conteniendo tampón Tris-HCL 50mM pH 7,8; 50µl de muestra y NADH 0,2mM. La oxidación del NADH fue igualmente corregida restando el valor de absorbancia obtenido en ausencia del extracto enzimático.

La actividad enzimática, expresada en U mg⁻¹ de proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y del coeficiente de extinción molar del NADH ($E=6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.3.4.5. Determinación de la actividad dehidroascórbato reductasa (DHAR)

Se siguió el método descrito por Dalton y col. (1993) con ligeras modificaciones. Consiste en la medida a 265 nm y 25°C, de la formación de ascorbato a partir de dehidroascorbato.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1ml conteniendo 0,85ml de tampón fosfato potásico 100mM, pH 6,5; 0,05ml de dehidroascorbato (DHA) 4mM; 0,5ml de glutatión reducido (GSH) 50mM y 0,05ml de muestra.

La reacción se iniciaba con la adición del DHA, midiéndose el incremento de absorbancia a 265nm en los primeros 30 segundos tras la adición, frente a un blanco de muestra con tampón de reacción, 10-50µl de muestra y GSH 50mM. El valor final de la absorbancia se corregía restando el valor obtenido en ausencia de extracto enzimático y multiplicado por un factor de 0,98, corrección debida al glutatión oxidado (GSSG).

La actividad enzimática, expresada en U mg⁻¹ de proteína, se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción y del coeficiente de extinción molar del ascorbato ($E=14 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.3.4.6. Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR)

Para su determinación se empleó el método de Hodges y col. (1997) basado en la medida del descenso de la absorbancia a 340nm por oxidación del NADPH.

El ensayo se llevo a cabo en un espectrofotómetro de doble haz UVIKON 930 (Kontron instruments) a 25°C. La mezcla de reacción, en volumen final de 1ml, contenía 0,73ml de tampón potásico 100mM, pH 7,8; 0,1ml de EDTA 15mM; 0,1ml de GSSG 100mM y 0,05ml de muestra. La reacción se inicia por la adición de 0,02ml de NADPH 10mM, siguiéndose su oxidación durante 1 min frente a un blanco de muestra.

En cada ensayo, cada medida correspondiente a la reacción problema que contenía el extracto enzimático se corrigió restando el valor obtenido con el blanco de muestra. La actividad enzimática expresada en U mg⁻¹ de proteína de NADPH oxidado min⁻¹ ml⁻¹, se calculo a partir de la velocidad inicial de reacción y del coeficiente de extinción molar para el NADPH (E=6,22mM⁻¹ cm⁻¹).

2.3.4.7. Determinación de la peroxidación lipídica (formación de malondialdehído, MDA)

La extracción se realizó a partir de 1g de muestra homogeneizada con 5ml de TCA 0,1% en un mortero con arena de mar lavada a 2°C y centrifugadas a 1000g durante 5min. A 1ml del sobrenadante se le añadió una mezcla de de TBA 0,5% en TCA al 20% y se calentó a 95°C durante 30min. La reacción se paró en un baño de hielo. Posteriormente se centrifugó y se midió inmediatamente su absorbancia a 532nm. A esta lectura se le restó la obtenida a 600nm. La cantidad de MDA-TBA fue calculada mediante el coeficiente de extinción molar (E=155mM⁻¹ cm⁻¹) (Heath y Packer, 1968).

2.4. NIVELES DE POLIAMINAS EN RELACIÓN CON LOS DIFERENTES ESTADÍOS DE DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE AZAFRÁN.

La determinación de los niveles endógenos de poliaminas se realizó en el departamento de ciencias Ambientales y Recursos Naturales del CBIO de la Universidad de Alicante, bajo la supervisión del Doctor José Luis Casas.

Para el análisis de los niveles endógenos de poliaminas se emplearon tejidos de los cuatro estadios que caracterizan el desarrollo de los embriones somáticos de azafrán.

2.4.1. Condiciones de crecimiento del material vegetal

Los explantes se cultivaron en medio MS completo, 3% sacarosa y 0,6% agar. La combinación de reguladores empleada fue 1mg/l de BAP y 0,05mg/l de ANA (Medio NAA).

Además de los cuatro estadios desarrollados en medio NAA, se estudiaron muestras del estadio 1 en medio N (0,5mg/l BAP y 0,1mg/l de 2,4D), dos variantes del estadio 4 que diferían en la concentración de ácido jasmónico (AJ) (0mg/l y 1mg/l) y muestras de tejidos vegetativos de cormos de campo en fase de dormancia.

2.4.2. Preparación de los extractos

Las muestras se tomaron a partir de callos embriogénicos, embriones en los distintos estadios y de secciones de cormo de azafrán según el ensayo. Se liofilizaron las muestras y se extrajeron las diferentes fracciones de poliaminas (libres, conjugadas solubles y conjugadas insolubles) siguiendo el protocolo descrito por Sharma y Rajam, 1995, con algunas modificaciones.

Se pesaron 0,1g de tejido liofilizado y se homogeneizaron con ayuda de un Ultraturrax en 10ml de acetona al 70%, para eliminar compuestos que pudieran retener las poliaminas y dificultar su extracción. El homogenado se centrifugó a 15.000g durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante. Los restos de acetona que no se pudieron eliminar decantando se dejaron evaporar durante 5-10 minutos.

Tras el lavado el tejido se homogeneizó con 10ml HCl 1N en frío y se mantuvo en baño de hielo durante una hora. Tras centrifugar a 15.000g durante 20 minutos el

sobrenadante se empleó en el análisis de poliaminas libres y conjugadas solubles, mientras que el precipitado se utilizó para el análisis de poliaminas conjugadas insolubles.

2.4.2.1. Hidrólisis de poliaminas conjugadas solubles

Para la extracción de poliaminas conjugadas solubles en ácido se separaron 150µl del sobrenadante obtenido anteriormente y se mezclaron con 150µl de HCl 12N. La mezcla se sometió a hidrólisis a 110° C durante 16-18 horas.

Una vez transcurrido este tiempo se procedió a la evaporación del HCl y el residuo seco se resuspendió en 150µl de HCl 1N.

2.4.2.2. Extracción e hidrólisis de poliaminas conjugadas insolubles

Para la extracción de la fracción de poliaminas conjugadas insolubles en ácido se lavó el precipitado varias veces con HCl 1N, para eliminar los restos de fracción soluble que hubieran podido quedar, y a continuación se procedió de dos formas distintas: Por un lado el precipitado se resuspendió y homogeneizó en presencia de NaOH 1N, centrifugando a continuación a 21.000g durante 20 minutos y utilizando el sobrenadante al análisis de la fracción conjugada insoluble de poliaminas, para lo cual se sometió a hidrólisis ácida en las condiciones descritas en el apartado anterior. Por otro lado, el precipitado resultante también se hidrolizó en esta ocasión directamente en presencia de HCl 12 N.

Tras la extracción e hidrólisis, todas las muestras se filtraron en lana de vidrio para a continuación proceder a la derivación química de las poliaminas presentes de manera que puedan ser cuantificadas mediante un detector de fluorescencia.

2.4.2.3. Derivación

El análisis de poliaminas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia requiere la previa derivación de las poliaminas presentes en los extractos para darles la capacidad de emitir fluorescencia.

La derivación sigue el protocolo descrito por Yokota y col. (1994).

Se tomaron 100µl de cada una de las fracciones (libres, conjugadas solubles y conjugadas insolubles) y se neutralizaron con CaCO₃ saturado (el volumen empleado dependió de la acidez de la muestra, osciló entre 20 y 50 µl). Una vez establecido un pH cercano a la neutralidad se añadieron 200µl de tampón borato 1M pH 7,7. Esta mezcla se agitó durante unos 15 segundos y se añadieron 200µl de N-9 fluorenilmetilcloroformiato (FMOC) 5mM en acetona. Se mezcló y se dejó reposar durante al menos un minuto para facilitar la unión del FMOC con los grupos amino libres de las poliaminas.

Se añadieron 200µl de 1-adamantamina 40mM en acetona para retirar el exceso de FMOC y se dejó actuar al menos un minuto. La mezcla se centrifugó a 5.000g 5 minutos y se filtró el sobrenadante a través de filtros de membrana de 0,45 µm de diámetro de poro. Finalmente, del filtrado se tomaron 100ml y se mezclaron con 700ml de la fase móvil inicial que se emplea en la cromatografía.

2.4.3. Identificación y cuantificación de poliaminas

Las poliaminas analizadas en este estudio fueron: diaminopropano (Dap), putrescina (Put) cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm). El equipo de cromatografía empleado (MERCK-HITACHI Ltd., Tokio, Japón) y las condiciones de separación fueron los siguientes:

- Inyector automático AS-4000.

- Bomba L-6200, se encarga de mezclar e impulsar la fase móvil:

 - Fase A: Ácido acético 100 mM, pH 4.4

 - Fase B: Acetonitrilo

La composición de la fase móvil inicial fue 50% A + 50% B. Para la separación de las poliaminas presentes en los extractos se aplicó un gradiente de B desde el 50% al 95% en 40 minutos; 5 minutos al 95% de B y finalmente un gradiente inverso durante 5 minutos con gradiente inverso para volver a las condiciones iniciales de 50% A, 50% B, que se mantuvieron durante 10 minutos para equilibrar la columna antes de inyectar una nueva muestra.

- Flujo de la fase móvil: 1ml min⁻¹

- Horno termostatzado L-5025, mantiene constante la temperatura de la columna cromatográfica a 40°C.
- Detector de fluorescencia F-1050: Longitud de onda de excitación 260nm. Longitud de onda de emisión 313nm.
- Columna: fase reversa, Kromasil 100 C-18 de 5µm de diámetro de poro, 20 x 0,46cm (Tracer Analítica, Tecnokroma ®, Barcelona)

Para la identificación de las poliaminas en los extractos se empleó la comparación del tiempo de retención de cada pico aparecido en los mismos con el tiempo de retención de una solución patrón de cada poliamina.

En la cuantificación de cada una de las poliaminas analizadas se empleó el método de patrón externo para poliaminas libres y conjugadas solubles y el patrón interno para poliaminas conjugadas insolubles.

Se prepararon previamente al análisis de las muestras cuatro soluciones patrón con concentraciones conocidas de las cinco poliaminas a estudiar (Dap, Put, Cad, Spd y Spm) y del compuesto que se utilizó como patrón interno (1,6-diaminohexano). Estas disoluciones patrón se derivaron y se analizaron en las mismas condiciones descritas para las muestras y con los valores de las áreas obtenidos en los análisis de los patrones se construyeron rectas de calibrado (ver anexo V).

Cada fracción de poliaminas analizada se analizó por triplicado, expresando los resultados en micromoles de poliamina por gramo de peso seco.

2.5. ENSAYOS PRELIMINARES DE MANIPULACIÓN GENÉTICA EN AZAFRÁN.

Se ensayaron varias estrategias para la transformación del material vegetal, empleando callos embriogénicos con nódulos en E1 creciendo de forma activa en medio N (MS completo + 30g/l de sacarosa + 0,5mg/l BAP y 0,1mg/l 2,4D) y diferentes partes de la planta de azafrán procedentes de medio natural (Babu y Chawla, 2000).

2.5.1. Transformación por biolística.

2.5.2. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

2.5.3. Transformación de protoplastos.

En este tipo de trabajos es necesario contar con construcciones genéticas adecuadas para introducir en las células de la planta. Estas construcciones genéticas se manejan en forma de plásmidos en el interior de la bacteria *E.coli*. Las construcciones empleadas en el presente estudio fueron pBIN 35S-mGFP4 (pBIN-GFP con el gen GFP, *green fluorescent protein*, como testigo) y pBI121 (pBIN-GUS, con el gen GUS, β -glucuronidasa, como testigo) y el EM (similar al pBI121 pero con un promotor EM diferente) (Figura 15). pBIN-GFP y pBIN-GUS poseen un promotor constitutivo (35S del virus del mosaico de la coliflor) mientras que en EM-GUS el promotor es específico de semilla. Los genes chivatos fueron 2, el gen GUS (Figura 16) y el gen GFP. La virtud de este tipo de genes es que sirven para detectar las regiones del tejido en las que hay expresión, por lo tanto regiones transformadas con la construcción genética. La β -glucuronidasa mediante su actividad enzimática origina un producto coloreado en presencia de X-GlcA (sustrato de la reacción) y la GFP emite fluorescencia cuando se excita con luz ultravioleta.

Los plásmidos se crecieron en el interior de *E. coli*. Las células *E.coli* transformadas fueron seleccionadas gracias a una región del plásmido que codificaba resistencia a antibióticos (resistencia ausente en la cepa de forma natural). En este caso kanamicina, en una concentración de 25 a 50mg/l. Una vez amplificado el plásmido se extrajo por medio de un kit Maxiprep (Kit purification Quiagen, Quiakit 50). Este plásmido amplificado se empleó en los procesos de transformación.

Se realizó un ensayo de tinción natural de los callos de azafrán para determinar el nivel de actividad endógena de la β -glucuronidasa en los callos en función del tipo de callo y su morfología externa, la tinción se evaluó al cabo de 12, 24 y 72h con solución de tinción y la misma diluida $\frac{1}{2}$.

Para detectar la expresión de los genes testigo se empleó RT-PCR. Esta técnica consiste en una retrotranscripción por medio de una transcriptasa inversa del ARN que se está expresando en el tejido (por medio de precipitación con LiCl_2) y una amplificación por PCR de la secuencia del gen de interés (con los oligonucleótidos complementarios a los extremos del gen). Finalmente se visualizó el producto en un gel de agarosa al 0,3%.

El nivel de detección de este método se determinó por medio de la visualización de varias diluciones del vector amplificadas:

0,01ng, 0,1ng, 1ng, 10ng

Con los 36 ciclos normales de PCR se detectaron a partir de 1ng de ADN del vector para detectar concentraciones inferiores fue necesario duplicar el número de ciclos y aparecieron gran cantidad de artefactos.

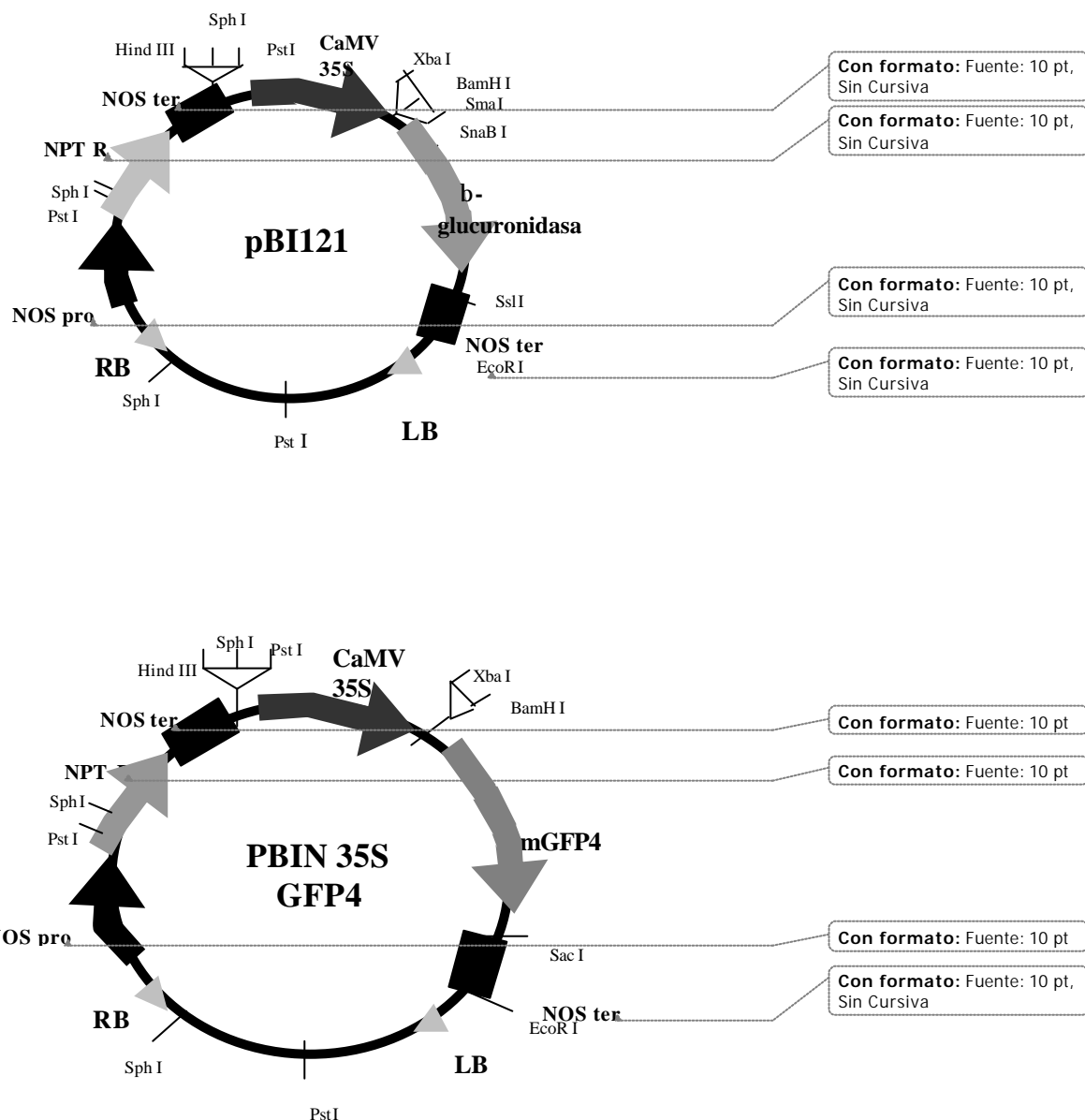


Figura 15. Plásmidos empleados en los ensayos de transformación genética. El plásmido EM-GUS que no aparece en la Figura es similar al pBI121 con un promotor EM en lugar de CaMV 35S. Las secuencias NOS (pro y ter) son imprescindibles para la integración del vector en el plásmido Ti de *Agrobacterium*.

```

1  atgttacgtc  ctgtagaaac  cccaaccggt  gaaatcaaaa  aactcgacgg  cctgtgggca
61  ttcagtctgg  atcgcgaaaa  ctgtggaatt  gatcagcggt  ggtgggaaag  cgcgttacaa
121  gaaagccggg  caattgctgt  gccaggcagt  tttaacgata  agttcgccga  tgcagatatt
181  cgtaattatg  cgggcaacgt  ctggtatcag  cgcgaagtct  tcataccgaa  aggttgggca
241  ggccagcgta  tcgtgctgcg  ttctgatgcg  gtcactcatt  acggcaaagt  gtgggtcaat
301  aatcaggaag  tgatggagca  tcagggcggc  tatacgccat  ttgaagccga  tgtcacgcgg
361  tacgttattg  ccgggaaaaa  tgtacgtatc  accgtttgtg  tgaacaacga  actgaactgg
421  cagactatcc  cgccgggaat  ggtgattacc  gacgaaaacg  gcaagaaaaa  gcagtcttac
481  ttccatgatt  tctttaacta  tgccggaatc  catcgacgag  taatgctcta  caccacgcgg
541  aacacctggg  tggacgatat  caccgtgggt  acgcatgtcg  cgcaagactg  taaccacgcg
601  tctgttgact  ggcagggtgt  ggccaatggt  gatgtcagcg  ttgaactgcg  tgatgcggat
661  caacaggtgg  ttgcaactgg  acaaggcact  agcgggactt  tgcaagtggg  gaatccgcac
721  ctctggcaac  cgggtgaagg  ttatctctat  gaactgtgcg  tcacagccaa  aagccagaca
781  gagtgtgata  tctaccgct  tcgctcgcc  atccggtcag  tggcagtga  gggcgaacag
841  ttctctgatta  accacaaacc  gttctacttt  actggctttg  gtcgtcatga  agatgcggac
901  ttgcgtggca  aaggattcga  taactgtgct  atggtgcacg  accacgcatt  aatggactgg
961  attggggcca  actcctaccg  tacctcgcat  tacccttacg  ctgaagagat  gctcaactgg
1021  gcagatgaac  atggcatcgt  ggtgattgac  gaaactgctg  ctgtcggctt  taacctctct
1081  ttaggcattg  gtttcgaagc  gggcaacaag  ccgaaagaac  tgtacagcga  agaggcagtc
1141  aacggggaaa  ctcagcaagc  gcacttacag  gcgattaaag  agctgatagc  gcgtgacaaa
1201  aaccaccaa  gcgtggtgat  gtggagtatt  gccaacgaac  cggatacccg  tccgcaaggt
1261  gacggggaat  atttcgcgcc  actggcgga  gcaacgcgta  aactcgaccc  gacgcgtccg
1321  atcacctgcg  tcaatgtaat  gttctgcgac  gctcacaccg  ataccatcag  cgacctcttt
1381  gatgtgctgt  gctgaaccg  ttattacgga  tggatgtcc  aaagcggcga  tttggaaaacg
1441  gcagagaagg  tactggaaaa  agaacttctg  gcctggcagg  agaaactgca  tcagccgatt
1501  atcatcaccg  aatacggcgt  ggatacggtt  gccgggctgc  actcaatgta  caccgacatg
1561  tggagtgaag  agtatcagtg  tgcattggctg  gatattgata  accgcgcctt  tgatcgcgtc
1621  agcgccgctg  tcggtgaaca  ggtatggagt  ttgcgcgatt  ttgcgacctc  gcaaggcata
1681  ttgcgcgctg  gcgtaacaa  gaaagggatc  ttactcgcg  accgcaaacc  gaagtcggcg
1741  gcttttctgc  tgcaaaaacg  ctggactggc  atgaacttcg  gtgaaaaacc  gcagcaggga
1801  ggcaacaat  ga

```

Figura 16. Secuencia del gen de la β -glucuronidasa (GUS).

2.5.1 Transformación por biolística.

En biolística se empleó una pistola de genes BIO-RAD BH-100 (USA). El sistema se basa en la acumulación de presión de helio en una cámara anterior hasta un valor determinado por un disco de ruptura. Esta presión es la que desplaza una membrana a la que se adhieren las partículas (de oro o tungsteno) que funcionan como vehículo del plásmido y lo transportan hasta el interior de las células. La membrana choca con una rejilla de camino en la cámara de vacío, por medio de este choque las partículas salen disparadas y se dispersan para impactar en el tejido que se encuentra en la parte inferior de esta cámara. (Watad y col., 1998).

Las condiciones de disparo para transformación de callos de azafrán fueron las siguientes:

- Material vegetal: callos en estadio 1 creciendo en medio N (0,5mg/l de BAP y 0,1 de 2,4D).

- Plásmidos: pBIN-GUS y EM GUS
- Tipo de partículas: micropartículas de oro de 1µm de diámetro
- Disco de ruptura: 1100 psi
- Dispersión: 1 anillo
- Distancia del cañón al tejido: 9 y 12cm

Se realizaron ensayos con callos E1 (procedentes de meristemas de cormo por un lado y de estigmas de la flor de azafrán por otro, los callos de estigma de azafrán fueron cedidos por la profesora Ana Vazquez del Departamento de Genética de la Universidad Complutense de Madrid) y E2, y con diferentes partes de la planta de azafrán; cormos completos, raíces, hojas, meristemas y capa epidermal. Se emplearon dos réplicas por tejido un control y una réplica para revelado, con las tres construcciones ensayadas. En el caso de pBI GUS hubo una tercera réplica con tres disparos para detectar expresión del gen por RT-PCR.

Las condiciones de disparo para cormos de azafrán fueron:

- Material vegetal: Cormos recogidos del campo y esterilizados
- Plásmidos: EM-GUS
- Tipo de partículas: micropartículas de oro de 1µm de diámetro
- Disco de ruptura: 1100 psi
- Dispersión: 1 anillo
- Distancia del cañón al tejido: 12cm

Se emplearon dos réplicas por tejido un control y una réplica para revelado, con las tres construcciones ensayadas.

2.5.1.1. Preparación de las bolas

Se pesaron 30mg de micropartículas, oro o tungsteno y se añadió 1ml de Et-OH al 70%. Se agitaron en *vortex* de 3 a 5 minutos y se mantuvieron a remojo 15 minutos más. Se consideró importante en este paso evitar al máximo la exposición de las partículas en seco al aire debido a su fácil oxidación. Posteriormente se centrifugó a 6000rpm como máximo de 5 a 10 segundos y se descartó el sobrenadante, repitiendo los lavados al

menos tres veces. Se añadió 1ml de agua estéril se agitaron en *vortex* 1 minuto, se dejaron a remojo 1 minuto más y se centrifugó (como en el paso anterior), eliminándose el sobrenadante. Posteriormente se repitieron los lavados al menos otras 3 veces. Finalmente se redisolviéron en 500µl de glicerol al 50% estéril.

Las partículas así preparadas pudieron mantenerse a 4°C (las de oro) y a -20°C (las de tungsteno).

2.5.1.2. Unión del plásmido a las partículas

Las partículas se agitaron en *vortex* 5 minutos para deshacer las aglomeraciones (se mantuvieron en agitación durante la preparación). Para cada 6 disparos se tomaron en primer lugar 50µl de la solución de partículas y se añadieron, sin cesar la agitación, 5µl de ADN (concentrado a 1µg/µl), 50µl de CaCl₂ 2,5M y 20µl de espermidina 0,1M. Se continuó la agitación de 2 a 3 minutos, se dejó reposar 1 minuto y se centrifugó como máximo a 6000g de 2 a 3 segundos eliminándose nuevamente el sobrenadante. Se añadieron 140µl de etanol al 70%, se reposó 1 minuto y se desecharon, se añadieron 140µl de etanol al 100% dejamos 1 minuto y se desecharon. Finalmente se redisolvió la muestra en 48 µl de etanol al 100% (resultado mejor en baño sonificado evitándose al máximo la aglomeración de las partículas).

Las membranas portadoras del plásmido se esterilizaron con etanol al 70%. Una vez secas se añadieron 8µl a cada membrana para cada uno de los disparos. Se dejaron secar de nuevo y se colocaron, una por disparo, en el *macrocarrier* de la pistola de genes.

Tras ser disparado el material se dejó crecer en oscuridad durante dos días (20±2°C) y después se reveló con una solución de revelado (50mM Na₃PO₄ pH 7,2, 50mM dimetilformamida, 0,5mM K₃FeCN₆, 0,5mM KnFeCN₆ y 0,48µM X-GlcA) para detectar la actividad de la β-glucuronidasa o se expuso a luz ultravioleta para detectar la expresión del gen de la GFP. El revelado se realizó en oscuridad durante 12-24h en el caso del gen GUS y fue instantáneo en la detección de actividad GFP.

En algunos casos se efectuaron varios disparos sobre el mismo tejido para aumentar la proporción de células transformadas.

2.5.2. Transformación mediada por *Agrobacterium*.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* empleada en este ensayo fue la G1 y se transformó con la construcción pBIN-GUS (Vector PBI 121)(ver Figura 15).

2.5.2.1. Transformación de *Agrobacterium* por electroporación

Una vez extraído el plásmido se transformó con el la cepa de *Agrobacterium*

Para cada transformación a realizar se emplearon 3ml de cultivo de *Agrobacterium* (crecido la noche anterior a 28°C). Primero se distribuyó el cultivo en tubos Eppendorf de 2ml y se centrifugó las bacterias a 13.000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se resuspendió en 1ml de MgSO₄ (previamente enfriado en hielo) y se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm, en centrifuga refrigerada a 4°C; este paso se repitió 2 veces más. Después de eliminar el sobrenadante se resuspendieron las bacterias en 1ml de glicerol estéril frío al 10%, se centrifugaron 5 minutos a 13.000 rpm (a 4°C) y se resuspendieron en 200µl de glicerol estéril frío al 10%. Con este proceso las bacterias adquirieron la competencia necesaria para poder ser transformadas con el plásmido. Finalmente se dejaban en hielo hasta su uso.

Cada transformación se realizó con 40µl de la suspensión de *Agrobacterium* y 500ng de ADN del plásmido. Se mezcló y agitó suavemente antes de pasar la muestra a una cubeta de electroporación (era importante mantener en hielo todos los elementos durante el proceso hasta electroporar).

Las condiciones de electroporación fueron: 25mF y 2,5Kv, control de resistencia 200 ½. Tras la electroporación se añadieron 400µl de medio de crecimiento de *Agrobacterium* sin antibiótico en la misma cubeta y se dejó crecer durante dos horas a 28°C. Pasadas las dos horas se pipeteáron 200µl de cultivo y se sembraron en placas con kanamicina para seleccionar las colonias transformadas. Se incubaron de 2 a 3 días a 28°C.

2.5.2.2. Transformación de los tejidos

Se crecieron las bacterias en un medio de cultivo apropiado hasta una densidad óptica determinada. Se empleó con éxito una D.O. de 0,2 a 2 y se usó directamente este cultivo para la transformación por medio de infección de los tejidos de la planta. Para facilitar la infección (ya que *Agrobacterium* no infecta azafrán de forma natural) se empleó:

- Infiltración: se ayudó la entrada de las bacterias en el tejido a infectar aplicando un vacío suave durante 5 minutos, hasta que se apreciaba burbujeo en los tejidos.
- Sonicación: en este caso la entrada de las bacterias en las células vegetales se facilitó con la aplicación de ultrasonidos en baño sonificado. La sonicación fue a temperatura ambiente durante 30-50 segundos.
- Heridas: realizando pequeñas heridas en la superficie del tejido para que la infección se produjera por estas fisuras. La infección natural de *A. tumefaciens* está facilitada por la existencia de heridas en las plantas, ya que las sustancias que se liberan facilitan la infección.
- Infección de suspensiones: se inocularon las bacterias en una suspensión de células de azafrán y se cocultivaron durante 2 días a 28°C. La infección fue más sencilla puesto que las células estaban totalmente accesibles.

Tras la infección bacterias y tejido vegetal se mantuvieron en cocultivo durante uno o dos días para dar tiempo a que terminara de producirse la infección. Después se eliminaron las bacterias restantes con cefotaxime (20mg/l) y se lavaron los tejidos con alcohol al 70% varias veces para eliminar los restos de bacterias muertas que podrían originar falsos positivos. Este proceso se realizó por triplicado de forma que una de las réplicas se reveló, otra se dejó crecer en medio con el antibiótico de selección (kanamicina) y otra se guardó para detección del plásmido insertado en el genoma de la planta, por medio de una extracción de ADN total y una PCR con los oligonucleótidos complementarios a los extremos del gen GUS.

2.5.3. Transformación de protoplastos.

En este caso el plásmido se empleó directamente para transformar protoplastos de diferentes tejidos de azafrán mediante un protocolo de fusión con PEG (polietilenglicol). Se obtuvieron protoplastos de callos en E1 y de cormos recogidos en el campo.

2.5.3.1. Obtención de protoplastos de azafrán

El tejido se machacó realizando cortes con un bisturí y se puso en contacto con la solución de digestión (0,25M Manitol, 1% Celulasa, 0,5% Macerocima, 0,1% Pectinasa, 0,5% BSA, 0,01% 2-Mercaptoetanol, 50mM CaCl₂ y 10mM Na-acetato pH 5,8). Toda

la noche en agitación en oscuridad a unos 25-30°C, se controlaron los protoplastos a microscopio hasta que la pared desapareció totalmente (células esféricas).

2.5.3.2. Transformación

Se recolectaron los protoplastos por centrifugación a 300g 5min y se lavaron varias veces con una solución de manitol 0,4M para eliminar totalmente los restos de enzimas del tejido. Se distribuyeron en tubos (15ml, los necesarios para el ensayo de transformación), se centrifugaron y se redisolviéron en una cantidad mínima de Manitol. Posteriormente se añadieron muy despacio 10ml de W5 (154mM NaCl, 125mM CaCl₂, 5mM KCl y 5mM glucosa, pH 5,8-6 con KOH) se mezclaron y centrifugaron.

Se resuspendieron en 5ml de W5 y se dejaron 30min en oscuridad, durante ese tiempo minutos se realizó un recuento de los protoplastos viables para establecer una frecuencia de transformación (tinción de viables con DAPI). Se centrífugó de nuevo y eliminamos todo el W5. Se añadió un volumen de MMM (15mM MgCl₂ 0,1% MES y 0,5M manitol pH 5,8), para obtener una concentración de células de 2x10⁶/ml.

Se distribuyeron los protoplastos en tubos, 300 microlitros por tubo y se añadieron 30 microlitros de plásmido (1µg/µl). Lentamente se añadieron 300µl de PEG (40% PEG, 0,4M manitol, 0,1M Ca(NO₃)₂, pH 8-9 con KOH) se agitó suavemente y se dejó incubar 10min. Pasado este tiempo se añadieron gradualmente 10ml de W5 muy despacio, se centrifugó y se redisolvió finalmente en 0,7ml de MS+sacarosa 0,4M.

La expresión del gen GUS se pudo detectar inmediatamente añadiendo la solución de revelado e incubando 12-16 horas en oscuridad.

Excepto en el caso de los protoplastos, que no se lograron regenerar, en el resto de transformaciones fue necesario establecer una curva de resistencia natural de los tejidos a diferentes dosis de kanamicina.

Las dosis de kanamicina fueron:

0mg/l	100mg/l
25mg/l	150mg/l
50mg/l	200mg/l
75mg/l	

La resistencia a Kanamicina se midió como el porcentaje de explantes supervivientes en cada una de las dosis empleadas.

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados mediante test de ANOVA, análisis de la varianza simple para un solo factor y análisis multivariante. Se emplearon además correlaciones y test de comparación de medias. Estos análisis se realizaron mediante EXCEL y SPSS 10x.

Los análisis realizados en SPSS 10x gracias a la colaboración de Mario Plaza, Catedrático de Estadística de la Escuela de Ingenieros Industriales de Albacete.

Todos los análisis realizados en esta tesis pueden consultarse en el anexo estadístico, al final del texto.



3. RESULTADOS

3.1. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AZAFRÁN.

3.1.0. Obtención de callos embriogénicos

Se emplearon tanto meristemos principales como secundarias a lo largo de todo el año. La respuesta no se obtuvo hasta la semana 7-8 (2° subcultivo). Los porcentajes de contaminación y de respuesta de los explantes se reflejan en la Tabla 12.

Mes	% contaminación	%Respuesta	
		Semana 7-8	Semana 12
Enero	25	-	-
Febrero	30	-	-
Marzo	20	-	-
Abril	15	-	-
Mayo	20	30	-
Junio	25	50	-
Julio	50	34	20
Agosto	40	58	42.5
Septiembre	45	45	-
Octubre	50	12,5	12,5*
Noviembre	Nd	Nd	Nd
Diciembre	Nd	Nd	Nd

*Solo meristemos laterales

Nd. Datos no disponibles

Tabla 12. Porcentaje de inducción de callogénesis en 8 y 12 semanas de meristemos centrales y laterales de corno de azafrán.

Las tasas de contaminación fueron muy elevadas en todos los meses. Este hecho se debió a que el material de partida procedió en todos los casos del campo, por lo que además de contaminación superficial existía una elevada proporción de contaminación endógena. Los meses con menor contaminación de los explantes fueron los del inicio de la primavera (en Noviembre y Diciembre no hay datos).

Aunque se logró la formación de callo a partir de meristemos en los meses de mayo a octubre solo el material procedente de julio, agosto y octubre se mantuvo en los

sucesivos subcultivos. En todos los casos la respuesta se observó en troncos meristemáticos centrales del corno, excepto en el mes de Octubre en el que sólo respondieron las yemas laterales (ver Figura 17).

En el primer subcultivo hubo una pérdida de parte del material, sobre un 15%. Por medio de este proceso de formación de callo se obtuvieron en su mayor parte nódulos proembriogénicos, que con un correcto desarrollo originaran embriones somáticos de azafrán.

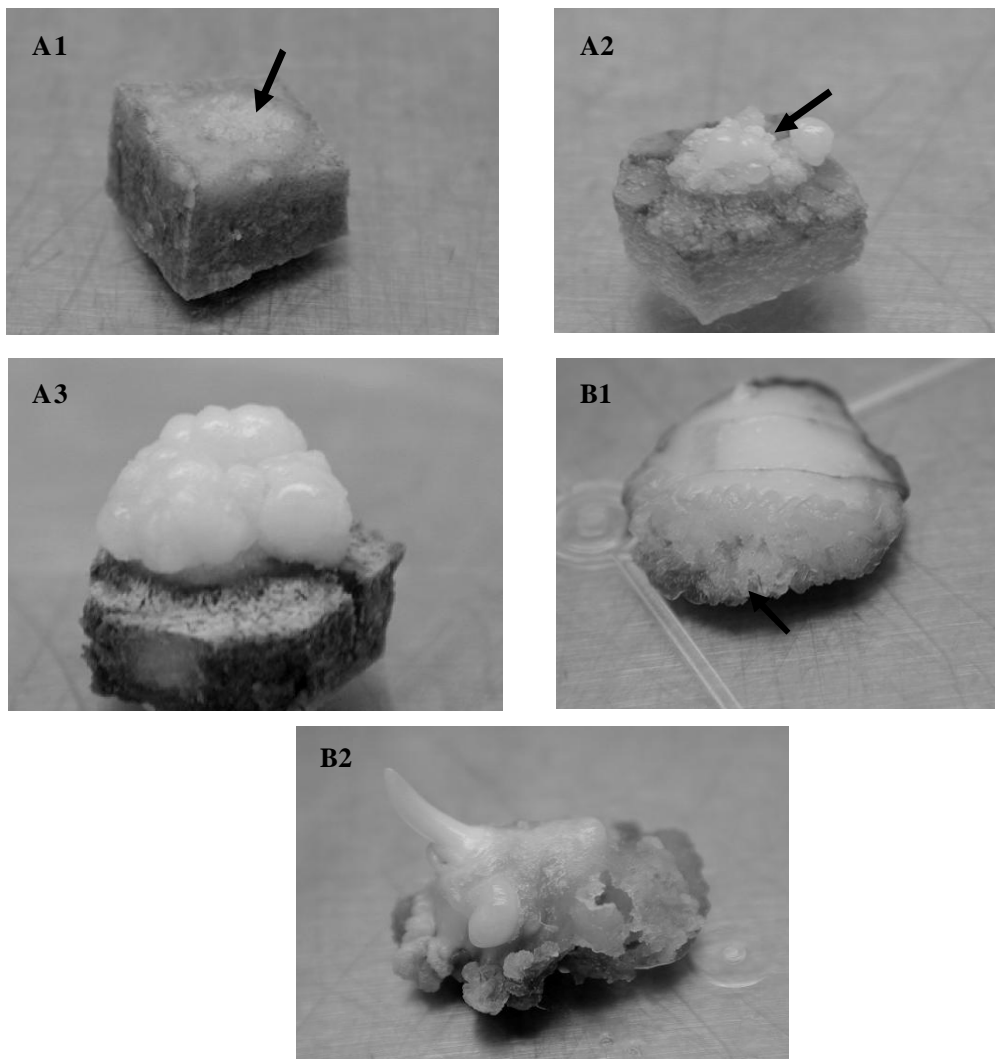


Figura 17. Desarrollo secuencial de callos a partir de regiones meristemáticas del centro del corno de azafrán (A1-A3). Desarrollo secuencial de callos a partir de yemas laterales de corno de azafrán (B1,B2). Las flechas señalan los nódulos embriogénicos.

3.1.1. Experimentos en medio sólido

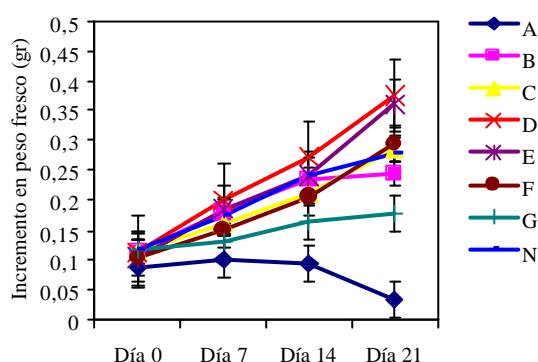
3.1.1.1. Multiplicación de embriones: Generación de material nodular

3.1.1.1.1. Primer ensayo de multiplicación sobre callos embriogénicos

Como ya se comentó en el capítulo anterior todos los ensayos a excepción de la obtención de callos embriogénicos se realizaron con material antiguo.

En la Figura 18 se refleja el efecto de cada uno de los medios de cultivo empleados (medios A, B, C, D, E, F, G y N, Tabla 3, capítulo 2) sobre los nódulos embriogénicos que conformaban los callos. Los datos completos se detallan en el anexo de datos.

A)



B)

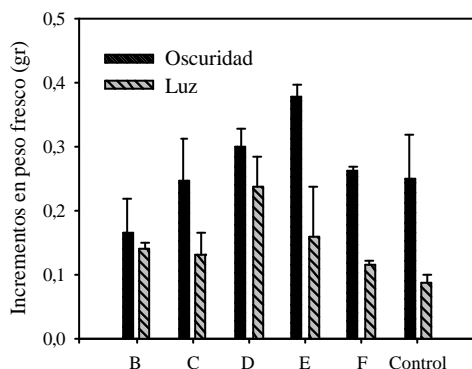


Figura 18. A, evolución del peso fresco de los callos en los diferentes tratamientos durante tres semanas. B, comparación del incremento en peso fresco en luz y oscuridad al cabo de tres semanas de los callos en el primer ensayo de multiplicación.

Medios: A: 0.1mg/l BAP, 0.1mg/l AJ D: 2mg/l BAP, 1mg/l ANA G: 1mg/l ANA, 1mg/l AJ
 B: 0.5mg/l BAP, 0.1mg/l AJ E: 2mg/l BAP, 0.5mg/l ANA N: 0.5mg/l BAP, 0.1mg/l 2.4D
 C: 1mg/l BAP, 0.1mg/l AJ F: 2mg/l BAP, 0.05mg/l 2.4D

El crecimiento en los medios A (0,1mg/l BAP y 0,1mg/l de AJ) y G (1mg/l ANA y 1mg/l de AJ) fue muy bajo. Estos dos medios se descartaron del total a la hora del análisis puesto que la mayor parte de los explantes dejan de crecer en las dos primeras semanas (Figura 18A). En la Figura 18A se aprecia que el incremento en peso a lo largo de las dos primeras semanas fue gradual y similar en los medios B, C, D, E, F y N. Sin embargo en la última semana de cultivo las diferencias entre los medios se acentuaron. El crecimiento fue mayor en los medios D, E y F que en el resto. La respuesta óptima en multiplicación de los callos se observó en el medio D (1mg/l ANA y 2mg/l BAP); significativamente mejor que el medio N. En la Figura 18B se representa la respuesta al cultivo en condiciones de luz y oscuridad en los medios ensayados. Los análisis completos se presentan en el anexo estadístico.

En la Figura 18B se aprecia claramente un mejor desarrollo de los callos en oscuridad que en luz en todos los casos, excepto en el medio B donde las diferencias fueron muy pequeñas. Los medios A y G se excluyeron al ser los más desfavorables para el desarrollo. Los medios con una mejor respuesta eran D, E y F, aunque las diferencias con respecto al control (medio N, 0,5mg/l BAP y 0,1mg/l 2,4D) fueron significativas únicamente en el caso de los medios D y E.

En una segunda aproximación se dividieron el total de medios ensayados en varios grupos realizando un análisis por ANOVA univariante con interacción.

En el primer grupo formado por los medios A, B y C se midió el efecto de la combinación de varias dosis de BAP (0,1, 0,5 y 1mg/l respectivamente) con 0,1mg/l de AJ. El aumento en peso fue significativamente mayor en el medio C (1mg/l de BAP) que en los medios A y B (0,1 y 0,5mg/l de BAP). El efecto de la presencia o ausencia de luz no resultó significativo ni la interacción de esta con la dosis de BAP (ver anexo estadístico).

Un segundo grupo lo constituirían los medios D y E en los que se combinaron varias dosis de ANA (1mg/l y 0,5mg/l respectivamente) con 2mg/l de BAP. No son significativas las diferencias con respecto a aumento en peso entre estos dos medios. Sí son significativas en los dos casos las diferencias entre la respuesta en luz y en oscuridad, la interacción con la dosis de ANA fue casi significativa ($p=0,063$). La luz

afectó de forma negativa al crecimiento de los callos y este efecto podría estar relacionado con la dosis de ANA del medio.

Un ultimo grupo estaría formado por los medios F (0,05mg/l 2,4D y 2mg/l BAP) y N (control, 0,5mg/l BAP y 0,1mg/l de 2,4D). En este caso se combinaron dosis de 2,4 D y BAP. Las diferencias entre los dos medios no fueron significativas aunque hubo un efecto negativo de la luz en el crecimiento de los callos embriogénicos e interacción de este efecto con la dosis de 2,4D.

No hubo respuesta en diferenciación en ninguno de los casos.

3.1.1.1.2. Segundo ensayo de multiplicación

Después de analizar los resultados del primer experimento se realizó otro ensayo en el que se comparaban las dos auxinas empleadas 2,4D y ANA en combinación con BAP. Los datos de este ensayo están relatados en el anexo de datos. En la Figura 19 se presenta la evolución del peso fresco de los callos embriogénicos en tres semanas.

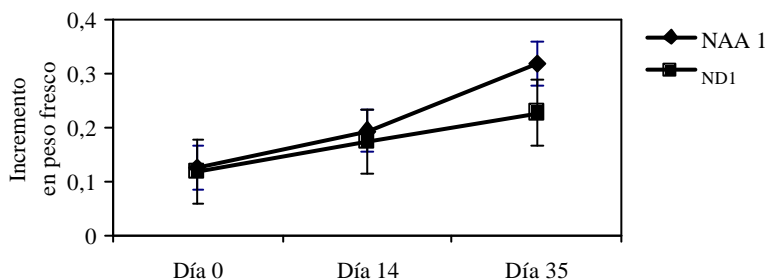


Figura 19. Incremento en peso fresco en gramos de callos en multiplicación con ANA y 2,4D en tres semanas.

NAA 1: 1mg/l BAP, 0.05mg/l ANA.

ND1: 1mg/l BAP, 0.1mg/l 2.4D

Observando los datos en conjunto (Figura 19) el incremento medio en peso fresco en gramos de los callos en el medio con ANA pareció ser mayor que con 2,4D. Las diferencias fueron más importantes a partir de la tercera semana en cultivo. Por medio de un test de comparación de medias las diferencias resultaron significativas. En la Figura 20 se muestra la respuesta en luz y en oscuridad.

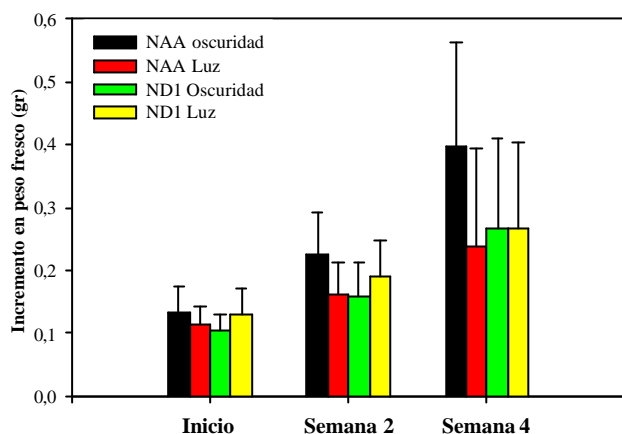


Figura 20. Medias de aumento en peso de callos en multiplicación en luz y en oscuridad en los medios ND1 y ANA.

Cuando separamos los datos de crecimiento en función de la presencia o ausencia de luz el crecimiento en el medio ANA era mayor a lo largo de las cuatro semanas. Aunque las diferencias no parecían significativas en un primer momento sí lo fueron cuando se separaron los datos en explantes crecidos en luz y explantes crecidos en oscuridad. El crecimiento de los callos en oscuridad era significativamente mayor con ANA que con 2,4D. Las diferencias en luz no resultaron significativas. Además de las diferencias en crecimiento también se observaron diferencias en la morfología de los callos. En el caso del medio ANA el callo crecía de forma más nodular manteniéndose friable. En el medio ND1 hubo un engrosamiento de los nódulos preexistentes; estos se diferenciaron parcialmente lo que hizo que su crecimiento fuera más lento (Figura 21).

Se establecieron cuatro tipos de callos embriogénicos nodulares, según las características de los nódulos, para determinar la evolución de la morfología del callo en este estudio. En todos los casos partimos de callos con nódulos de pequeño tamaño pero bien definidos.

En la Tabla 13 se presenta la evolución del material en estudio en los dos medios ensayados.

Tipo de nódulos		1.	2.	3.	4.	Estructuras endurecidas	Viables
Medios	ND1	25%	45%	20%	-	5%	85%
	ANA1	33%	60%	-	-	-	90%

- 1.pequeños, poco definidos.
- 2.pequeños, definidos.
- 3.grandes poco definidos.
- 4.grandes definidos

Tabla 13. Evolución de las características de los callos a lo largo de un mes.

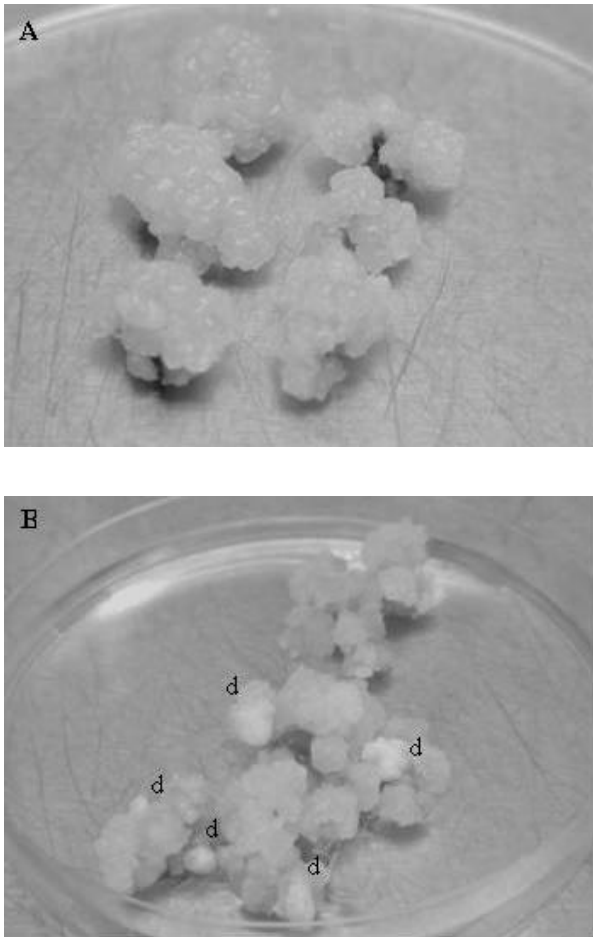


Figura 21. Callos de azafrán creciendo en medio con ANA, A, y en medio con 2.4D, B, en esta última se aprecian zonas donde el material está más diferenciado y endurecido (d).

3.1.1.2. Inicio de diferenciación de los embriones: formación de embriones dipolares

3.1.1.2.1. Primer ensayo de inducción: ensayo BAP/TDZ

En el anexo de datos se detallan los porcentajes de supervivencia y desarrollo del polo apical de los explantes en el primer ensayo de inducción de polaridad (las combinaciones de ANA, AJ y BAP ó TDZ respectivamente se relatan en la Tabla 5 del capítulo 2).

Se han considerado como callos viables aquellos que presentaban buen aspecto, nodular y disgregable y como callos con brotes aquellos embriones en los que ha comenzado el desarrollo de los polos apical y radicular pero no se aprecia todavía modificación basal, engrosamiento en la base del embrión. En las Figura 22 se muestra el crecimiento y desarrollo de los callos embriones empleados en este ensayo.

En la Figura 22A1 y B1 se ha representado el porcentaje de crecimiento de los explantes en cada uno de los medios, en ambos ensayos con BAP y con TDZ. Se apreció que existía menor crecimiento en valores extremos de combinaciones de reguladores debido a la falta de equilibrio entre las dosis de auxina y citoquinina. En los ensayos con BAP el equilibrio se encontró entre los medios 4 y 15 y en los 21 y 25 (Figura 22A1), para dosis de 0,1mg/l de AJ a partir de 0,25mg/l de ANA (ver anexo de datos totales), independientemente de los niveles de BAP. Para concentraciones superiores de AJ (0,5mg/l y 1mg/l) la dosis mínima de ANA necesaria para un correcto desarrollo de los callos embriogénicos fue de 0,5mg/l para 0,5mg/l de AJ y de 0,125mg/l de ANA en el caso de 1mg/l de AJ, para cualquiera de los tres niveles de BAP empleados. Las diferencias de crecimiento entre los tres niveles de BAP ensayados no fueron significativas.

En los ensayos con TDZ el equilibrio entre reguladores se observó entre los medios 13 y 19 (Figura 22B1) y 27 y 29 (ver anexo de datos totales). En este caso con niveles de 0,1mg/l de AJ era necesario al menos 1mg/l de ANA para un buen desarrollo de los explantes, independientemente de la concentración de TDZ. Para concentraciones superiores de AJ (0,5mg/l) debíamos incrementar bien la concentración de TDZ o bien la de ANA para establecer el equilibrio. Con respecto a las diferencias en crecimiento en función de las dosis de TDZ empleadas tampoco fueron significativas.

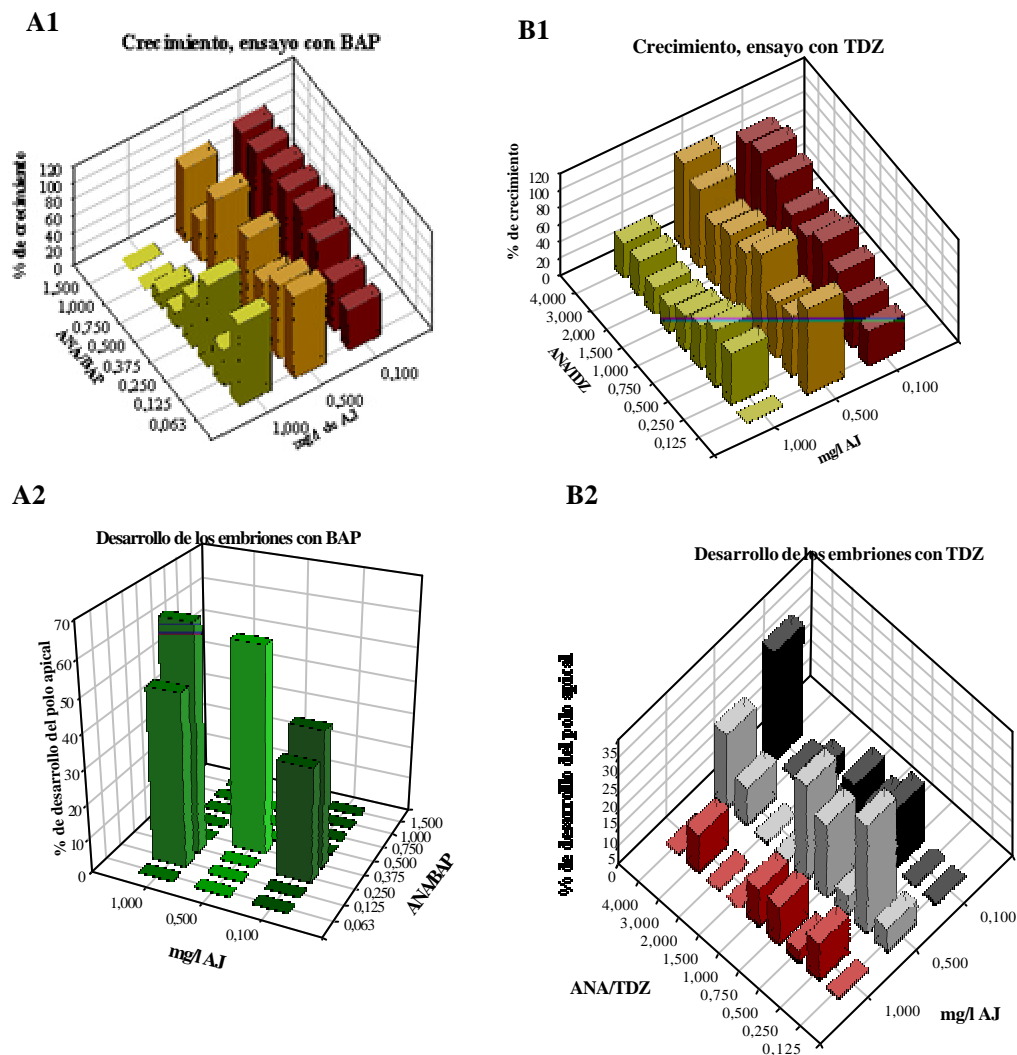


Figura 22. Crecimiento de los callos embriogénicos en medios con diferentes niveles de AJ y ANA combinados con BAP, A1 o TDZ. B1. Diferenciación de embriones polares en medios con diferentes niveles de AJ y ANA combinados con BAP, A2 o TDZ, B2.

En medios con BAP hay muy poco desarrollo de los embriones, si bien el valor medio de desarrollo del polo apical es mayor en medios con 2mg/l de BAP (Figura 22A2) que en medios con 0,5 o 1mg/l BAP (83% de polos apicales frente a 16 y 25%, ver anexo de datos totales). La dispersión de la respuesta hace que no pueda realizarse un análisis estadístico fiable.

En medios con TDZ los valores medios de desarrollo de embriones polares son superiores aunque hay más dispersión en la respuesta. En general hay mayor índice de respuesta en los valores medios de la tabla (Figura 22B2). Esto significa que el desarrollo de los embriones se induce mejor en medios con concentraciones intermedias de auxina (ANA) y AJ. El grado de desarrollo es independiente de la concentración de TDZ empleada (valores medios de 100%, 86% y 86% de desarrollo apical en 0,25, 0,5 y 1mg/l de TDZ respectivamente, ver anexo de datos totales).

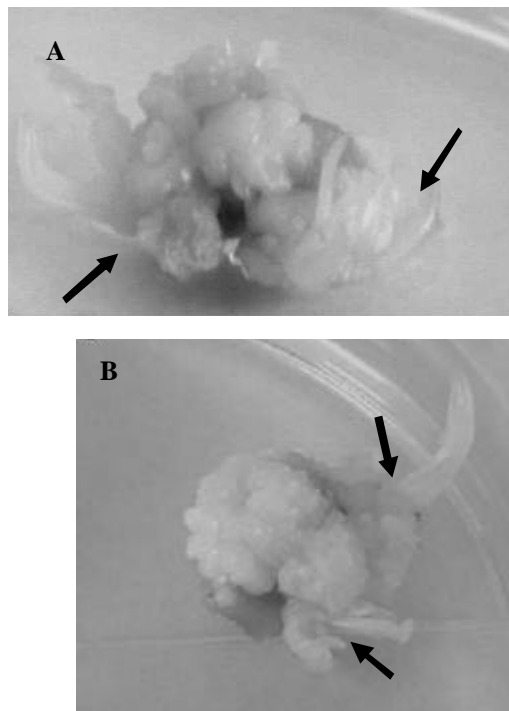


Figura 23. Primer ensayo de desarrollo del polo apical de los embriones. A, explante diferenciándose en medio con BAP (medio 24). B, explante con desarrollo apical en medio con TDZ (medio 18). Las flechas señalan el inicio de desarrollo del polo apical

3.1.1.2.2. Segundo ensayo de inducción: efecto del AJ

En un segundo ensayo de inducción de polaridad profundizamos en el efecto de las combinaciones de AJ (0, 0,1 y 0,5mg/l) con BAP (4 y 6 mg/l) y ANA (0,2 y 0,5mg/l). Ocho réplicas por medio ensayado. Los medios del 1 al 12 están descritos en la Tabla 6 del capítulo 2. En la Figura 25 se muestran los datos de viabilidad y desarrollo de estos

embriones en el segundo ensayo de inducción de la polaridad en el embrión En el anexo de datos se muestran los datos completos.

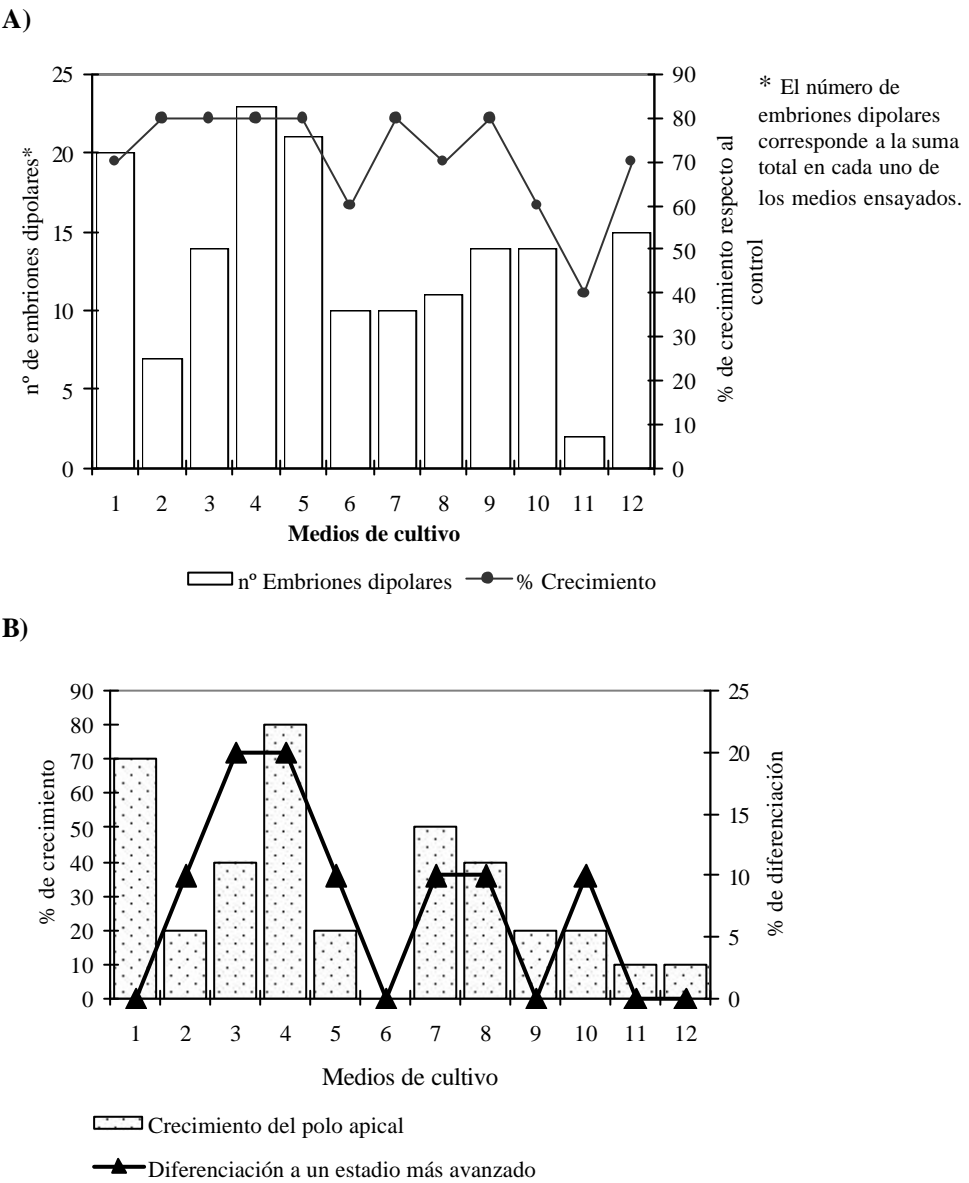


Figura 24. Respuesta de los explantes a las cuatro, A, y ocho, B, semanas en cultivo en los medios 1-12.

En la Figura 24A se observa que la respuesta al cabo de cuatro semanas fue buena, en general, en los medios ensayados. Exceptuando las combinaciones de los medios 2 y 11 (Tabla 5, capítulo 2) en el resto hubo al menos un embrión dipolar por explante. Los medios 1, 4 y 5 (Tabla 5, capítulo 2) fueron los que ofrecieron mejores resultados. Las concentraciones inferiores de ANA y de AJ combinadas con 4 o 6mg/l de BAP parecieron ser las más adecuadas.

En ocho semanas el establecimiento de relaciones de competencia entre los embriones dipolares redujo su número (Figura 24B). Este podría ser un buen indicador de la calidad de los embriones. Los medios en los que se mantuvieron mejores porcentajes de los embriones desarrollados inicialmente fueron 1, 4 y 7. Los medios 1 (0,2mg/l ANA y 4mg/l BAP) y 4 (0,2mg/l ANA, 6mg/l BAP) han sido señalados anteriormente como los más propicios para la diferenciación. En el medio 7 (0,5mg/l ANA y 4mg/l BAP) el número de embriones dipolares en la semana cuatro no resultó alto (diez en ocho explantes) sin embargo cinco de ellos se mantienen en la octava semana (Figura 25, A3).

En un último ensayo con los tres reguladores, ANA, BAP y AJ (0,05mg/l ANA + 0,5mg/l BAP y 0,1mg/l AJ), se midió, además de la diferenciación inducida, el tamaño del polo apical emergente y el grado de modificación basal de los embriones (maduración del embrión). Los resultados se expresan en la Tabla 14.

Respuesta	Medio control	Medio con 0,1mg/l AJ
Sin respuesta	75	65
Desarrollo del polo apical	25	35

Tabla 14. Porcentaje de diferenciación inducida en medios con 0,1mg/l de AJ en relación al control si AJ.

Las diferencias que aparecen en este caso entre el control y el tratamiento no parecen importantes (Figura 25, B1, B2, B3) además el número de explantes sin respuesta en este ensayo fue muy alto por lo que no han podido realizarse análisis estadísticos. A lo largo del estudio se profundizara más en el efecto de ácido jasmónico.

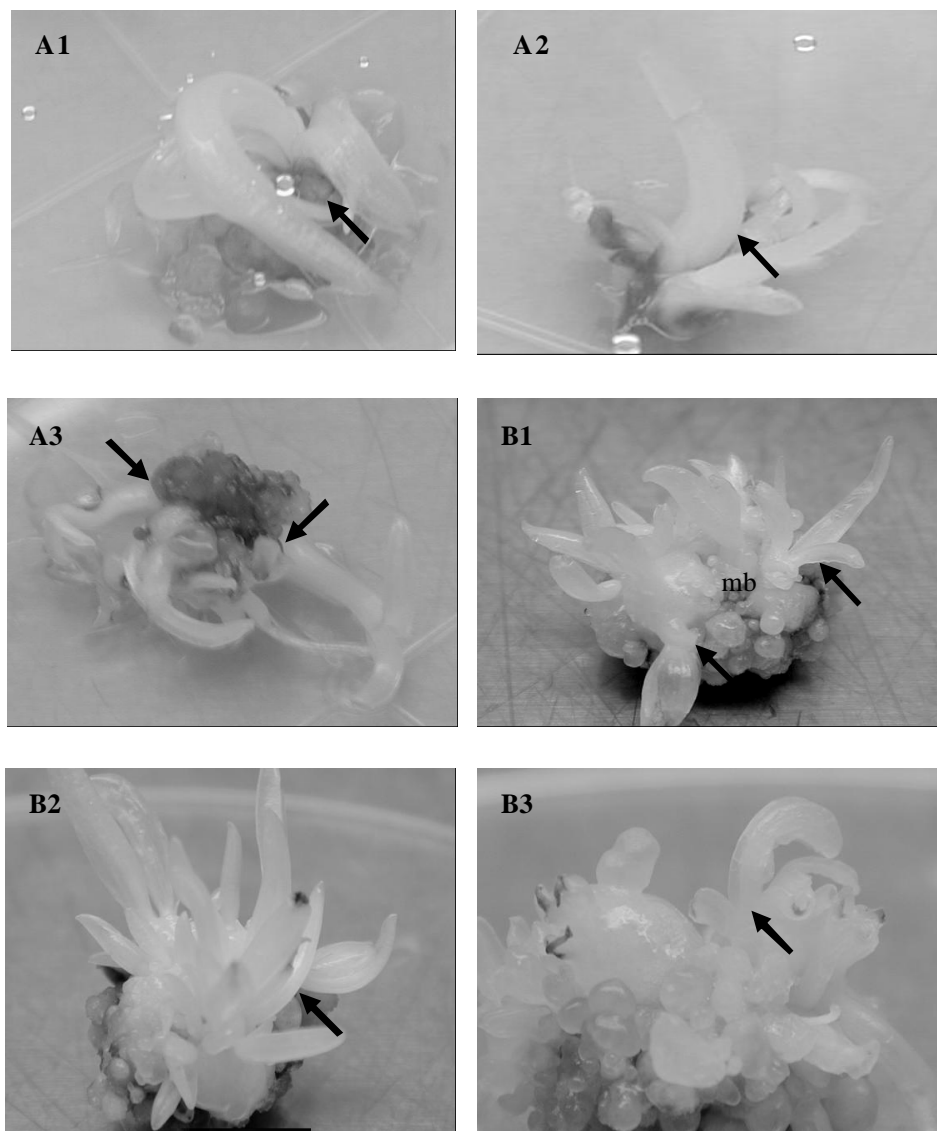


Figura 25. Fotografías A: desarrollo del polo apical en el segundo ensayo de diferenciación, embriones desarrollándose en medio 4, A1, 5, A2 y 7, A3. Fotografías B: ensayo de diferenciación con AJ, B1 y B2, callos embriogénicos con embriones dipolares en medio con AJ, mb indica inicio de modificación basal, B3, embriones dipolares en un callo control. Las flechas indican zonas con desarrollo apical.

3.1.1.2.3. Tercer ensayo de inducción: otros reguladores del crecimiento vegetal

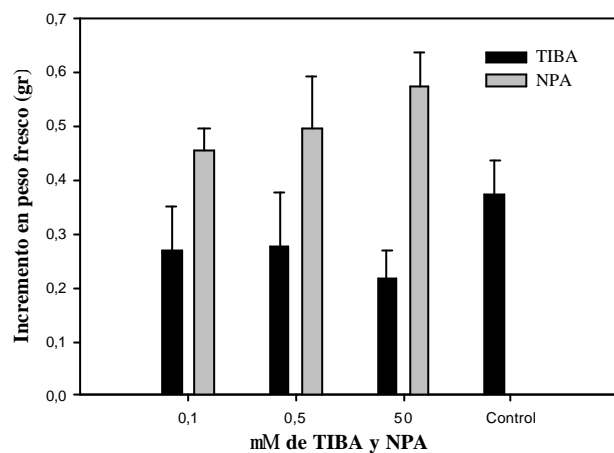
Se realizó un experimento con una batería de compuestos relacionados con los procesos de morfogénesis y desarrollo de los embriones, para comprobar su efecto en la inducción de la polaridad en el embrión y el desarrollo del meristemo apical. Los datos completos de este ensayo se muestran en el anexo de datos.

Un primer grupo de compuestos fueron los inhibidores del transporte polar de auxinas (TIBA y NPA en concentraciones, 0,1, 0,5 y 50 μ m). No hubo inducción de polaridad en cuatro ni en ocho semanas. El aumento en peso fresco de los callos embriogénicos en los tratamientos con TIBA fue inferior al control en todos los casos (aunque las diferencias no fueron significativas). En los tratamientos con NPA el incremento en peso fresco resultó significativamente mayor al control en las tres concentraciones empleadas. El efecto de estos dos compuestos en el desarrollo de los embriones fue nulo. En la Figura 26A se detalla el crecimiento y diferenciación de los callos embriogénicos en presencia de TIBA y NPA.

Un segundo grupo de compuestos son AVG y BITC (inhibidores de la actividad ACC sintasa) los datos completos se relatan en el anexo de datos. Al igual que ocurría con el TIBA ninguno de los dos compuestos proporcionó un crecimiento del tejido superior al del control. Además las concentraciones de 5 y 50 μ m de BITC resultaron letales. En este caso no hubo diferenciación del embrión en ninguno de los explantes analizados. En el la Figura 26B se muestra la respuesta de los explantes al tratamiento con AVG y BITC.

A)

Crecimiento de los explantes tratados con TIBA y NPA



B)

Crecimiento de los explantes tratados con AVG y BITC

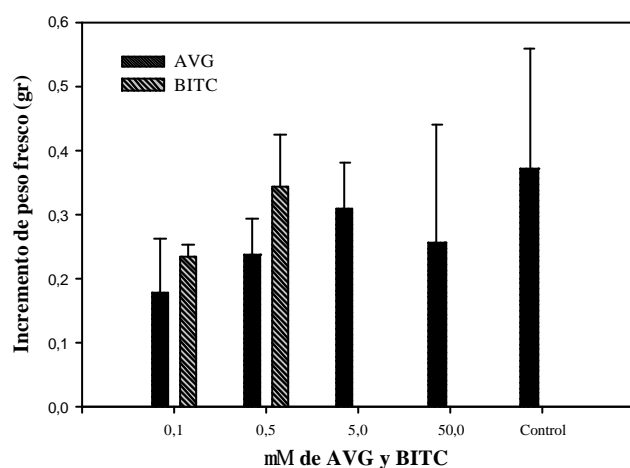


Figura 26. A, crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de TIBA y NPA. B, crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de AVG y BCIP.

Otro grupo de compuestos ensayados fueron los inhibidores de la ACC oxidasa (ácido salicílico y cloruro de cobalto). Los datos de este ensayo se detallan en el anexo correspondiente. Concentraciones elevadas (1 y 5 μ M de ácido salicílico y 10 y 100 μ M de CoCl) de ambos compuestos resultaron letales para los callos embriogénicos.

Se observó un inicio de diferenciación, se aprecia la polaridad en los embriones (Figura 27). En algunos explantes se detectó modificación basal tanto en callos embriogénicos tratados con ácido salicílico como en los tratados con CoCl. El crecimiento fue significativamente superior al control únicamente en el tratamiento con 0,1 μ M de CoCl. La respuesta de los callos embriogénicos al tratamiento con estos dos compuestos se muestra en la Figura 27A, B, C y D.

Un cuarto grupo lo constituyen los compuestos relacionados con la actividad del etileno y poliaminas: putrescina (antagonista del etileno) y tiosulfato de plata (inhibidor de los receptores de etileno). Los datos completos de este ensayo se muestran en el anexo adjunto. El tratamiento con 5 y 25 μ M de putrescina indujo en los explantes un crecimiento significativamente superior al control. Concentraciones inferiores no tuvieron este efecto. La formación de embriones dipolares estuvo favorecida por las concentraciones 0,5 y 5 μ M de putrescina (Figura 28, B). El tiosulfato de plata resultó letal en tratamientos con 15 y 75 μ M y el crecimiento con 0,6 μ M de tiosulfato de plata fue el mayor de los registrados en este ensayo (0,73 gramos de peso fresco como promedio en cuatro semanas, es decir, el explante triplicó y cuadruplicó su peso inicial). Tanto con 0,6 como con 3 μ M de tiosulfato de plata se observó diferenciación del polo apical en las masas de callos embriogénicos. En la Figura 28A, B, C y D se puede observar la respuesta de los explantes al tratamiento con putrescina y tiosulfato de plata. El phloroglucinol fue el último compuesto del ensayo, la media de aumento en peso resultó similar a la del control, aunque dosis superiores a 2,5 μ M resultaron letales para el explante. No hubo desarrollo completo del polo apical ni en cuatro ni en ocho semanas pero sí un inicio de diferenciación que fue mayor con 0,1 μ M de phloroglucinol.

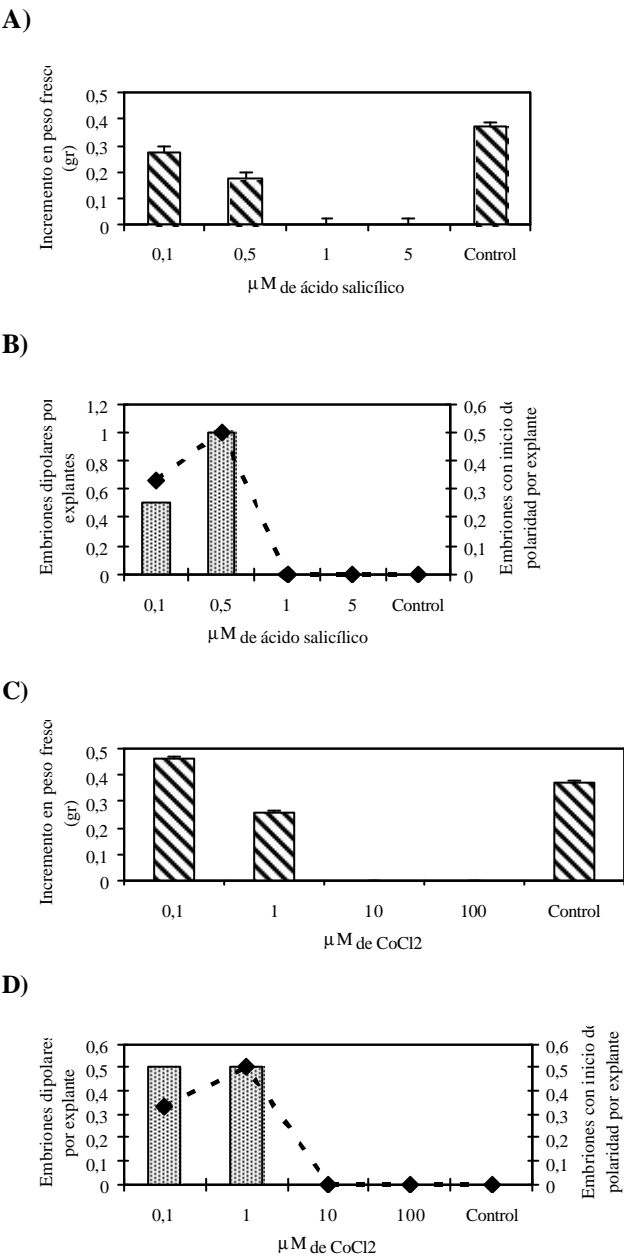





Figura 27. Incremento en peso fresco y desarrollo de los embriones con diferentes concentraciones de Ácido salicílico, A y B, y Cloruro de cobalto, C y D.

 Incremento en peso fresco en gramos
 Embriones bipolares por explante
 Embriones con inicio de polaridad por explante

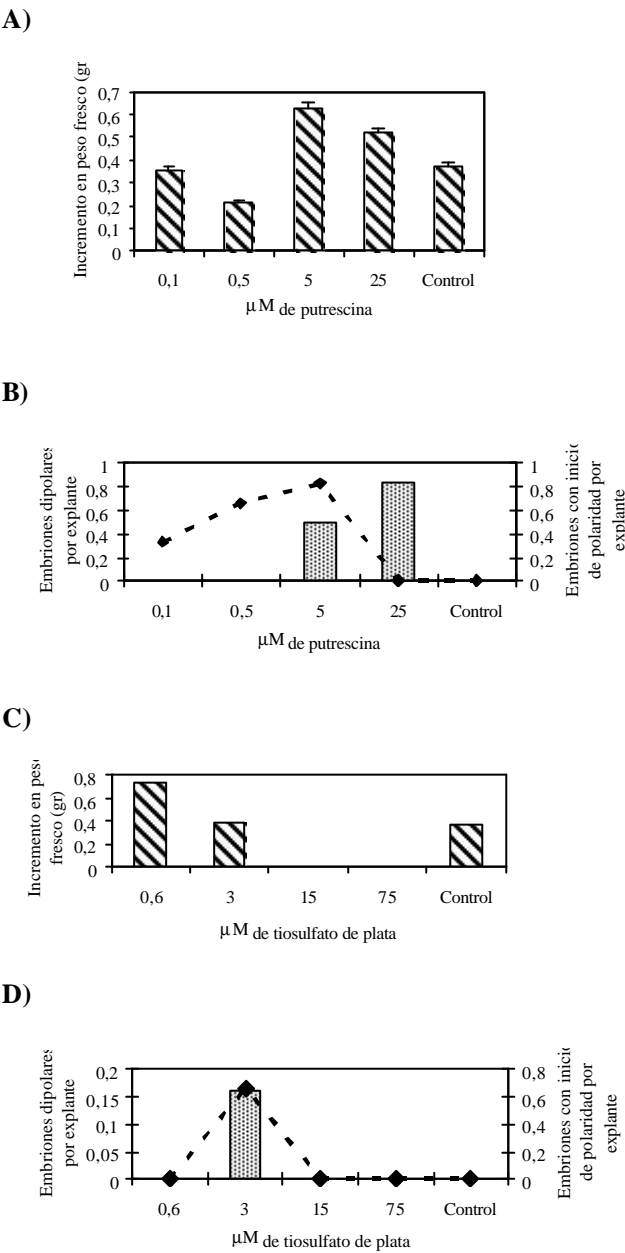
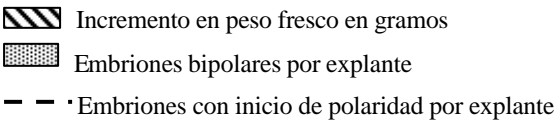


Figura 28. Incremento en peso fresco y desarrollo de los embriones con diferentes concentraciones de Putrescina, A y B y Tiosulfato de plata, C y D.



3.1.1.3. Estadío dipolar avanzado y formación de plántulas

3.1.1.3.1. Primer ensayo: Efecto del AJ en la formación del cormo

Tras los experimentos de polaridad se realizó un primer ensayo destinado a conocer el efecto del ácido jasmónico en diferentes concentraciones (0, 0,3, 0,5, y 1mg/l) sobre embriones dipolares. Se observó un efecto combinado de este compuesto con el aumento en la concentración de sacarosa (50g/l) y la disminución de las sales (1/2 MS). Las diferentes dosis de AJ se combinaron con 1mg/l de BAP. En la Figura 29A se presentan los resultados obtenidos en este ensayo. La formación de cormos se corresponde con un desarrollo de los embriones en E2 a E3 (maduración). Los datos completos se muestran en el anexo adjunto.

La formación de cormos en un medio con AJ en las condiciones descritas fue mayor que en el medio control (Figura 29A). Dentro de las diferentes concentraciones aplicadas en este ensayo las diferencias no fueron importantes, aunque el medio 2 presentó aparentemente mejor respuesta.

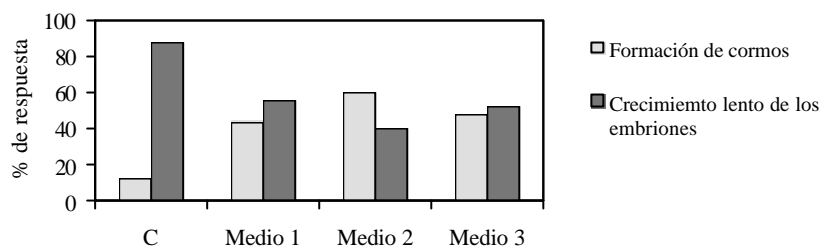
Para profundizar en las diferencias entre los medios 2 y 3 se realizó un experimento posterior. En la Figura 29B se representan incremento en peso fresco, formación de embriones dipolares y desarrollo del polo apical de los explantes (los datos completos se pueden consultar en el anexo correspondiente). Mediante un análisis de la varianza de un factor no se detectaron diferencias significativas ni en el incremento en peso fresco, ni en formación de embriones dipolares ni en el desarrollo del polo apical.

En la Figura 29B se representa el número medio de embriones dipolares por explante y variación media de la longitud del polo apical. Los valores medios de aumento en peso en cada uno de los tratamientos se expresan en gramos y las medidas en centímetros; debido a esto se aprecia cierto cambio de escala.

Las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas en ninguno de los parámetros estudiados. Existió además una dispersión importante en la respuesta, tanto en los medios ensayados como en el control. En el medio 2 no hubo ningún explante que presentara aumento en la formación de embriones dipolares. La causa pudo ser que la mayor parte de los callos iniciales poseían un embrión adelantado, más desarrollado, y este se limitó a crecer en el medio (Figura 30C). Se observó en todos los explantes un desarrollo del polo apical (Figura 30C y D).

En general la falta de sincronía en el desarrollo de las masas de embriones provocó una disminución del desarrollo de los embriones en algunos explantes para favorecer el desarrollo de 1 ó 2 de los embriones adelantados y viceversa. Incrementos en el número de embriones fueron en detrimento del crecimiento.

A)



B)

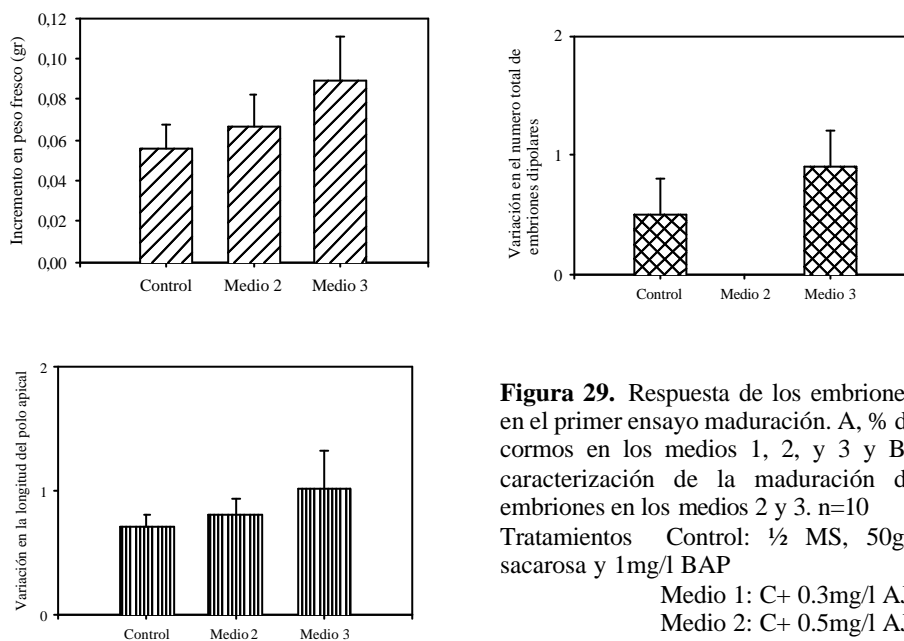


Figura 29. Respuesta de los embriones en el primer ensayo maduración. A, % de cormos en los medios 1, 2, y 3 y B, caracterización de la maduración de embriones en los medios 2 y 3. n=10

Tratamientos Control: ½ MS, 50g/l sacarosa y 1mg/l BAP

Medio 1: C+ 0.3mg/l AJ

Medio 2: C+ 0.5mg/l AJ

Medio 3: C+ 1mg/l AJ

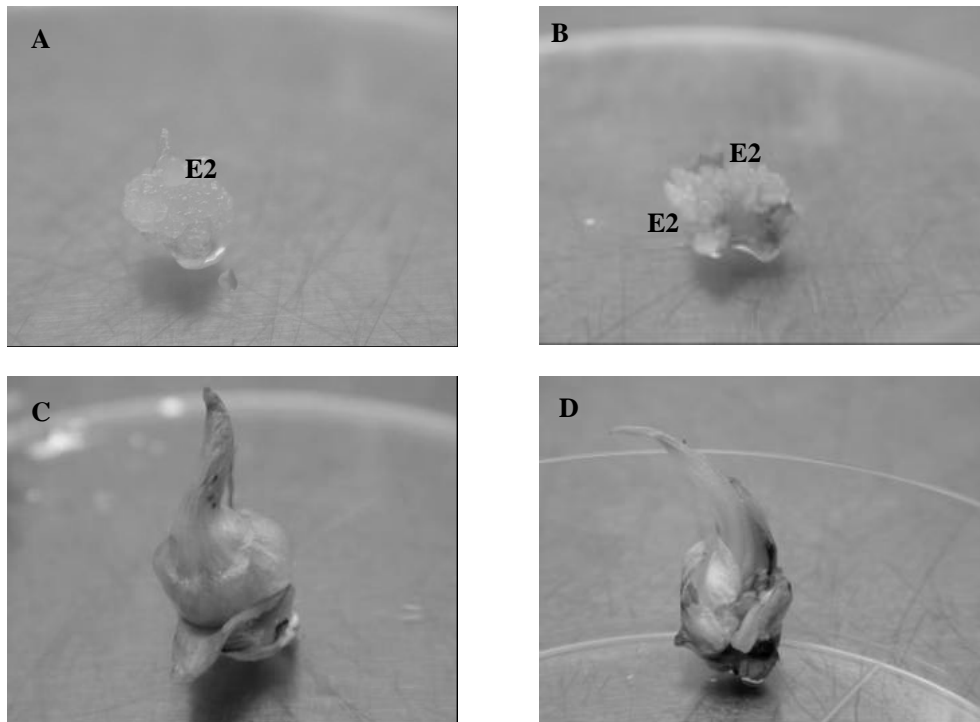


Figura 30. A y B, callos embriogénicos con embriones dipolares al cabo de cuatro semanas de tratamiento, en medio con ácido salicílico, A, y con putrescina, B. C y D, cormos en desarrollo, medios 2 y 3 respectivamente.

El siguiente medio ensayado fue MAD 1 (1/2 MS + 40g/l de sacarosa + 0.25mg/l de BAP y 0.5mg/l de AJ), una variante del medio 2 del ensayo anterior. Hubo respuesta en un principio aunque la mayor parte de los cormos originados no llegaron a desarrollarse totalmente.

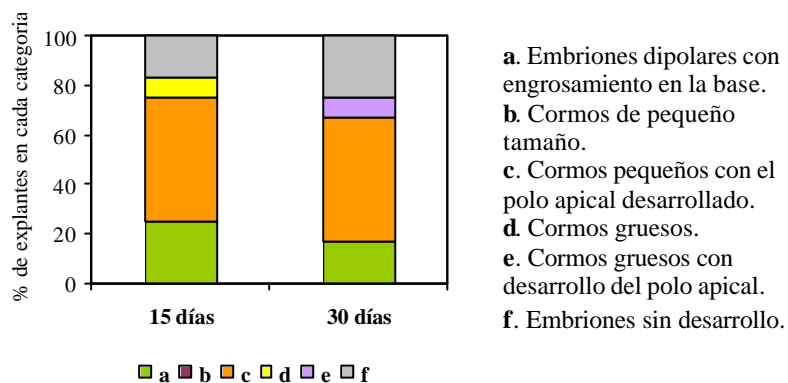
En la Figura 31A se detalla la evolución de los explantes en el medio MAD1 a los 15 y 30 días de tratamiento, la totalidad de las medidas de este ensayo están en el anexo de datos.

En la Figura 31A se aprecia que no hay una diferenciación clara al cabo de 30 días en este medio. Hay paso de los embriones en fase **a** a fase **c** (formación de cormo con desarrollo del polo apical) y de **d** a **e** (los cormos engrosan), pero el grueso de los explantes se encuentra en fase **c**.

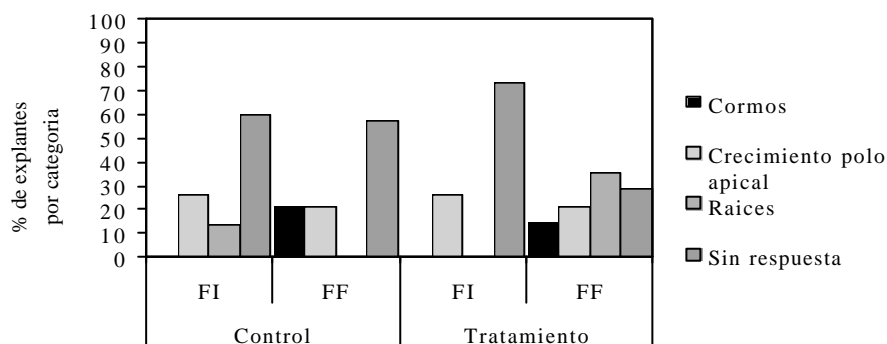
En un ensayo posterior se separaron los embriones dipolares en función del grado de desarrollo. No se encontraron apenas diferencias en la respuesta (Figura 32). En la

Figura 31 se aprecia que tanto en el tratamiento (1/2 MS + 50g/l de sacarosa + 1mg/l BAP + 1mg/l AJ). Como en el control los explantes mas inmaduros (F.I) responden menos (Figura 32, A y B) y que la formación de cormos se restringe a los explantes maduros (F.F) (Figura 32, C y D). Aunque como ya se ha señalado las diferencias no son significativas tras un análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Los datos en crudo se detallan en el anexo de datos.

A)



B)



FI, explantes iniciales poco desarrollados (ver Figura 32A)

FF, explantes iniciales en plena diferenciación (ver Figura 32C)

Figura 31. A, Formación secuencial de plántulas en medio MAD 1, respuesta en 15 y 30 días de tratamiento. B, diferentes respuestas al tratamiento con AJ en función del grado de desarrollo de los explantes.

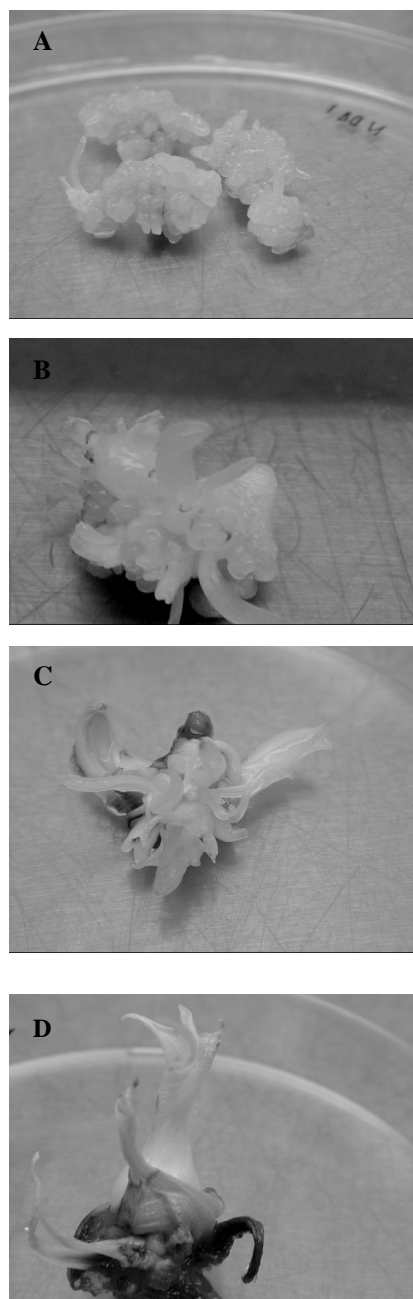


Figura 32. Explantes F.I. iniciales, A y pasados 30 días en medio 3, B (se aprecia el desarrollo del polo apical en la mayor parte de los explantes). Explantes F.F, iniciales, C y tras 30 días en medio 3, D (hay una maduración de los embriones en la mayor parte de los explantes).

3.1.1.3.2. Segundo ensayo: efecto combinado AJ/ Sacarosa.

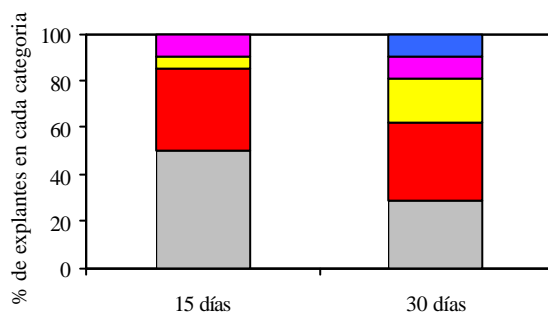
En un experimento posterior se realizó un tratamiento combinado de ocho semanas con dos combinaciones de medios diferentes, incorporando al medio de cultivo primero ácido jasmónico y después incrementos en la concentración de sacarosa y viceversa.

Tratamiento 1 Semanas 1-4 MSc + 30g/l sacarosa + 2mg/l BAP + 0.1mg/l 2,4D + 1mg/l AJ. Semanas 4-8 MSc + 40g/l sacarosa + 2mg/l BAP + 0.1mg/l 2,4D + 0.5mg/l AJ

Tratamiento 2 Semanas 1-4 MSc + 40g/l sacarosa + 2mg/l BAP + 0.1mg/l 2,4D Semanas 4-8 MSc + 50g/l sacarosa + 2mg/l BAP + 0.1mg/l 2,4D + 1mg/l AJ

En la Figura 33A y B se muestra la respuesta de los embriones a los tratamientos 1 y 2 en los primeros 15 y 30 días de cultivo. Los datos completos se presentan en el anexo de datos.

A)



B)

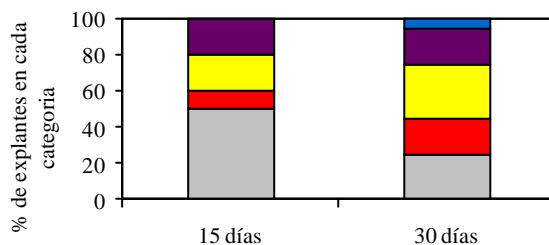


Figura 33. Respuesta de los explantes en 15 y 30 días al tratamiento combinado AJ/ Sacarosa:

Tratamientos 1, A, y 2, B, primera fase.

- a. embriones dipolares con desarrollo lento
- b. Embriones dipolares con modificación basal,
- c. Estructuras b con desarrollo del polo apical
- d. Estructuras c con hojas verdes
- e. Plántulas formadas

En las primeras cuatro semanas hubo una diferenciación de los explantes en ambos tratamientos, disminuyeron los explantes del grupo **a** y aumentó el resto de grupos.

En general todavía no se apreciaban diferencias importantes, aunque en el tratamiento 1 a las cuatro semanas ya había desarrollo de los embriones; con el tratamiento 2 (Figura 35) el crecimiento parecía ser mejor.

En la segunda parte del experimento las diferencias entre tratamiento 1 y tratamiento 2 fueron más patentes. En el tratamiento 1 la viabilidad fue de un 95% frente al 74% del tratamiento 2. El porcentaje de explantes sin respuesta resultó similar en ambos tratamientos, 15% en el tratamiento 1 y 21% en el tratamiento 2. Un 20-21% de los explantes no se diferenció totalmente presentando callo en la base al final del tratamiento, el mismo porcentaje en los dos tratamientos. Finalmente la formación de plántulas fue muy superior en el tratamiento 1 (60%) a la obtenida tras el tratamiento 2 (37%).

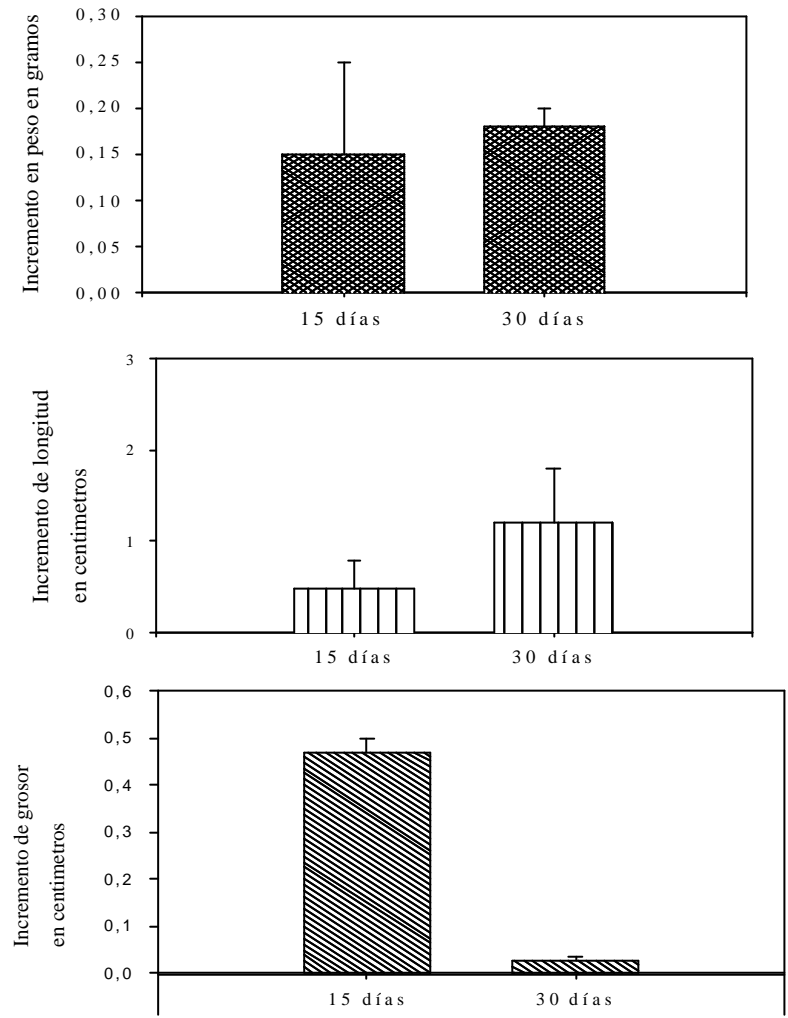
La evolución de estos explantes que se diferenciaron hasta plántulas en ambos tratamientos se muestran en la Figura 34. Los datos completos de este ensayo se encuentran en el anexo de adjunto.

Al analizar las diferencias entre la primera y la segunda quincena del tratamiento 1 para cada uno de los parámetros (prueba *t*-student para dos muestras emparejadas) se observó un aumento en peso y en grosor significativos en la segunda quincena. En la primera quincena de desarrollo hubo un mayor crecimiento en longitud (las diferencias en longitud no resultaron significativas pero $p=0,08$ para una cola).

A diferencia de lo que se ha descrito para el tratamiento 1, en el tratamiento 2 las diferencias entre el aumento de peso de los explantes en la primera y segunda quincena no fueron significativas. Si lo fueron las diferencias en aumento de longitud y en grosor. En los primeros quince días los explantes aumentan en grosor y en los quince días siguientes en longitud.

Como se ha comentado la respuesta resultó mayor en el tratamiento 1, es decir aplicando en primer lugar el ácido jasmónico y posteriormente incrementándose la concentración de sacarosa.

A)



B)

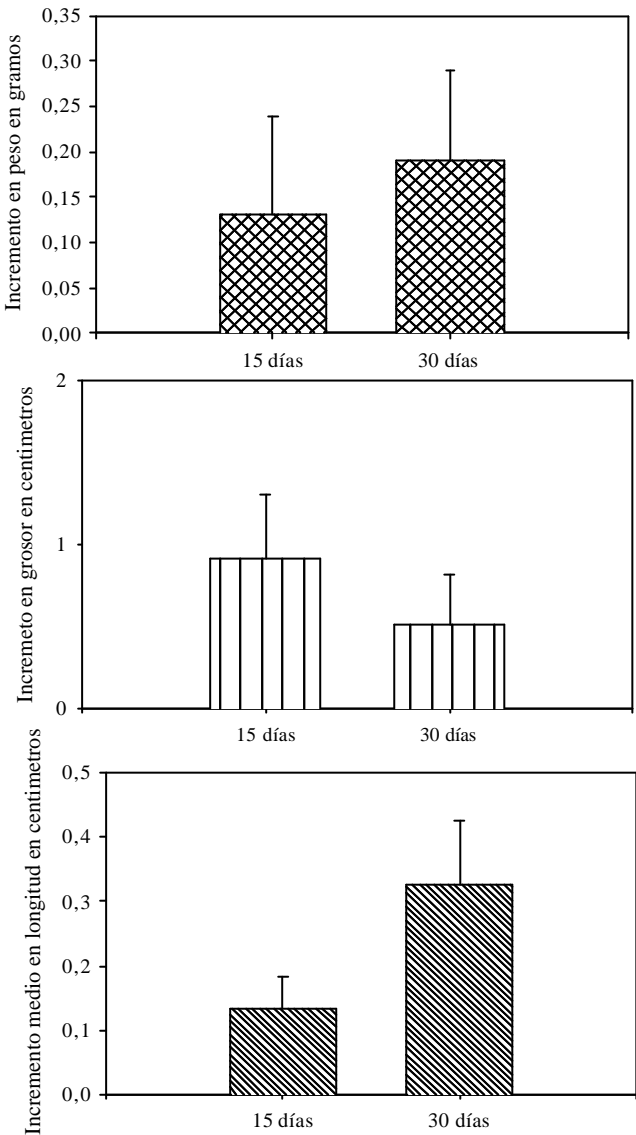


Figura 34. Valores medios de incremento en peso, longitud y grosor de los explantes desarrollados hasta plantas en los tratamientos 1, figuras A, y 2, figuras B.

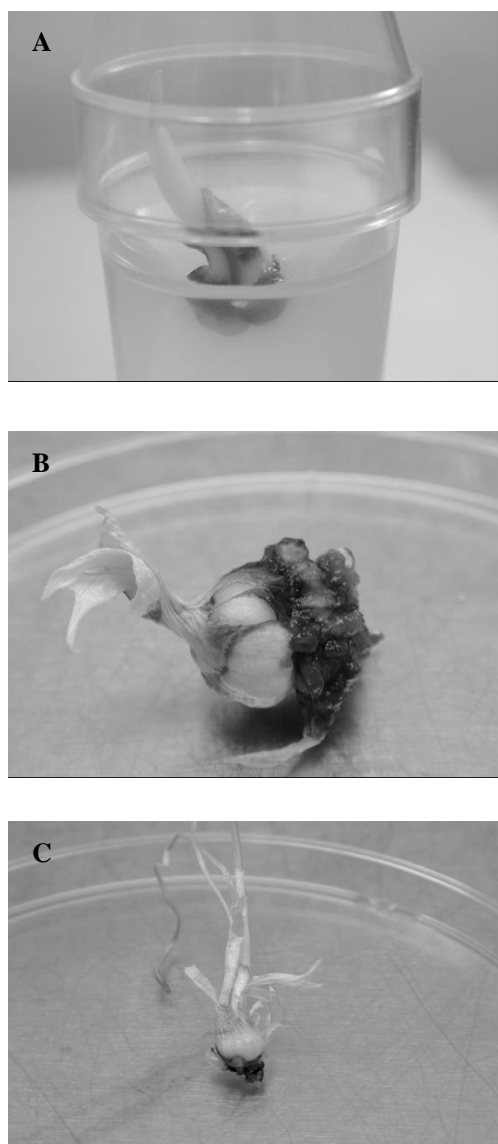


Figura 35. Explante creciendo en tratamiento 1, explante tipo **d** al cabo de 15 días de cultivo, A. Respuesta final de los explantes al tratamiento 1, B, y tratamiento 2, C.

En la línea de estos ensayos con AJ y sacarosa diseñó el último experimento sobre embriones dipolares. Embriones de dos tipos, procedentes de tratamiento previo con AJ y sin AJ pero en ambos casos crecidos en las cuatro semanas anteriores en un medio con 40g/l de sacarosa. La respuesta de los embriones al tratamiento en función del medio de procedencia se muestra en el Figura 36. Los datos completos están en el anexo.

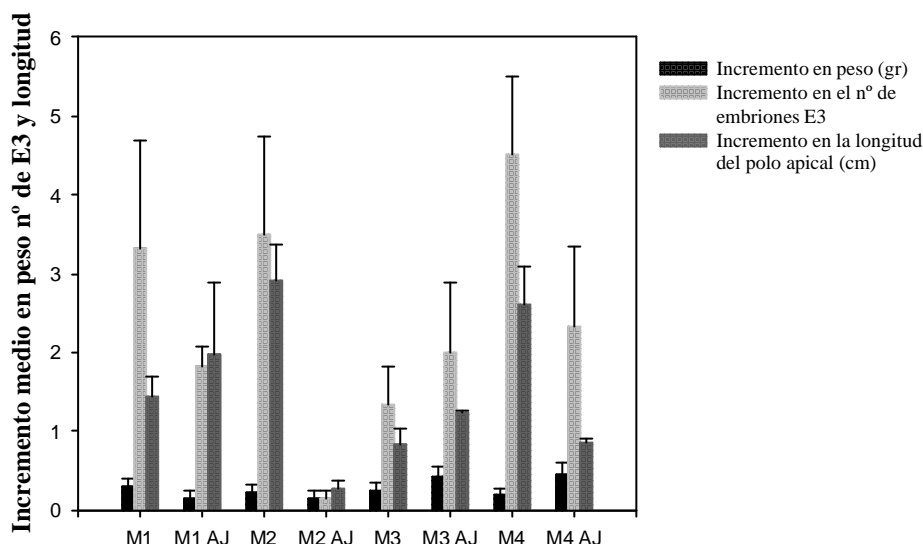


Figura 36. Respuesta de los embriones en E2 en función del pretratamiento con AJ

- M1.** MS, 40g/l sac, 1mg/l BAP y 0,5mg/l AJ (Control).
- M1 AJ.** MS, 40g/l sac, 1mg/l BAP y 0.5mg/l AJ. Procedentes de un medio con AJ.
- M2.** MS, 40g/l sac, 1mg/l BAP y 1mg/l AJ.
- M2 AJ.** MS, 40g/l sac, 1mg/l BAP y 1mg/l AJ. Procedentes de un medio con AJ.
- M3.** ½ MS, 40g/l sac, 10mg/l BAP y 5mg/l AJ.
- M3 AJ.** ½ MS, 40g/l sac, 10mg/l BAP y 5mg/l AJ. Procedentes de un medio con AJ.
- M4.** ½ MS, 40g/l sac, 1mg/l BAP y 1mg/l AJ.
- M4 AJ.** MS, 40g/l sac, 1mg/l BAP y 1mg/l AJ. Procedentes de un medio con AJ.

En un primer estudio sobre el efecto del tratamiento previo con AJ observamos que sólo eran significativas las diferencias con respecto a los aumentos en peso en los medios 3 y 4. En el resto de parámetros medidos la dispersión de los datos hace que no se pongan de manifiesto tales diferencias. Cuando comparamos los cuatro tratamientos, únicamente eran significativas en peso las diferencias entre los tratamientos 1 y 2 con el

3 en explantes procedentes de pretratamiento con AJ (p para una cola 0,022 y 0,011 respectivamente).

No había diferencias significativas en la diferenciación de los embriones a estadio dipolar, ni en el aumento de la longitud del polo apical.

La mayor parte de los explantes maduraron pero siguieron dependiendo de la porción basal de callo para su supervivencia.

3.1.1.3.3. Tercer ensayo: efectos del GA₃ en la maduración del cormo

Para inducir la maduración final de los embriones se diseñó un experimento con diferentes concentraciones de ácido giberélico (0, 0,025, 0,1, 0,5 y 1mg/l de GA₃) en ausencia de otras hormonas.

Además del desarrollo del embrión hasta plántula, nos interesa en esta fase el tamaño final que alcanza el cormo. En la Figura 37A se representa la respuesta en los 5 medios ensayados en luz y oscuridad puesto que no aparecieron diferencias. La tabla con los datos se encuentra en el anexo.

Se observó un mejor desarrollo con las concentraciones bajas de GA₃. Aunque no hubo diferencias en los parámetros medidos entre luz y oscuridad cuando se examinaron los explantes se apreció claramente que los cormos formados tenían mucho mejor aspecto en luz que en oscuridad (Figura 37).

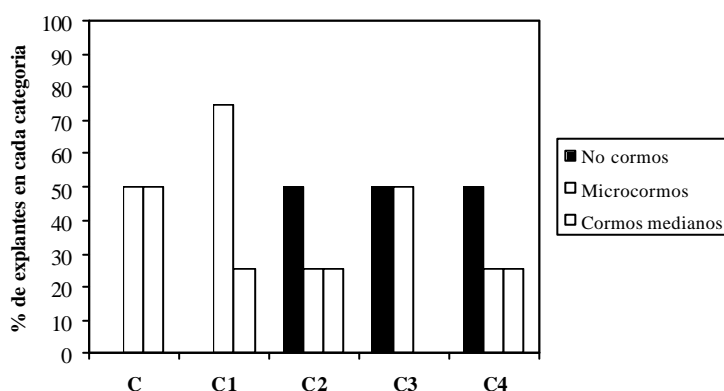


Figura 37. Desarrollo de cormos y microcormos en función del nivel de GA₃.

C1: C + 0.025mg/l GA₃

C2: C + 0.1mg/l GA₃.

C3: C + 0.5mg/l GA₃.

C4: C + 1mg/l GA₃

3.1.2. Cultivo en sistemas de inmersión temporal

3.1.2.1. Medios para la optimización de la proliferación.

El material empleado en estos ensayos fue procedente de las líneas de callos embriogénicos que se mantenían en cultivo en el laboratorio, material antiguo. En el primer ensayo se emplearon una serie de compuestos para evitar los problemas de hiperhidratación y oxidación del tejido, consecuencia de la transferencia del material de un sistema cultivo en medio sólido a un sistema líquido o semilíquido. Los valores medios de incremento en peso y el porcentaje de oxidación de los callos embriogénicos se muestran en la Figura 39. Los datos se detallan en el anexo de datos. Los sistemas empleados fueron Rita (Figura 38).

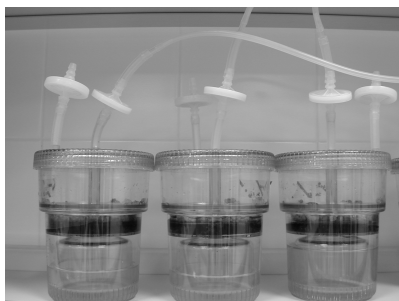


Figura 38. Detalle de los sistemas de inmersión temporal en funcionamiento

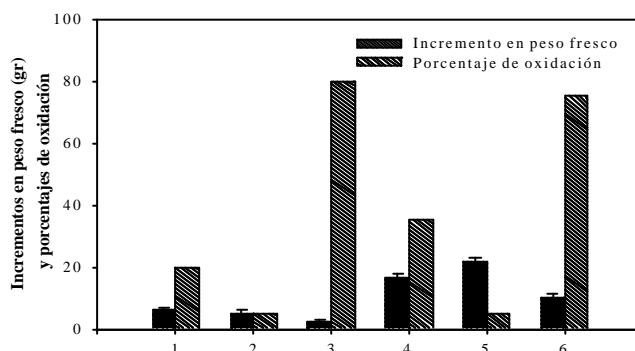


Figura 39. Efecto de los diferentes compuestos ensayados sobre la proliferación del material embriogénico en SIT. Asc. Ácido ascórbico, PVP. Polivinilpirrolidona, PAC. Paclobutrazol.

1. ½ MS+200mg/l Asc

3. ½ MS+5mg/l PAC

5. MS+500mg/l PVP

2. ½ MS+500mg/l PVP

4. MS+200mg/l Asc

6. ½ MS+5mg/l PAC

En todos los casos la combinación de reguladores fue 0,1mg/l 2,4D y 0,5mg/l BAP.

Una vez establecido que el PVP era capaz de evitar la oxidación e hiperhidratación de los tejidos (Figura 38) se realizó un barrido de concentraciones de PAC para determinar la causa de la oxidación tan elevada de los explantes en medios con PAC. Se midió el grado de hiperhidratación y el rendimiento en peso fresco con diferentes concentraciones de PAC, los resultados se presentan en la Figura 40. La tabla de datos se puede consultar en el anexo de datos.

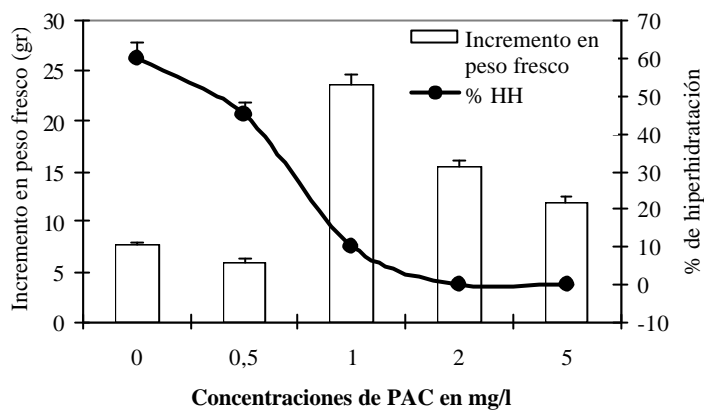


Figura 40. Estudio de la respuesta con diferentes concentraciones de paclobutrazol. n=3

Tras analizar estas 5 concentraciones se estableció 1mg/l de PAC como la concentración óptima para el desarrollo del material en estos sistemas (Figura 41C y D). Así mismo se comprobó que la respuesta del material a una combinación de PVP y PAC era mucho peor que el empleo de cada uno de éstos por separado.

3.1.2.2. Generación de material nodular

El ensayo de reguladores se realiza en un medio MS completo, 30g/l sacarosa y 500mg/l de PVP, con las combinaciones indicadas anteriormente. Los resultados se expresan en la Figura 41) y los datos completos en el anexo.

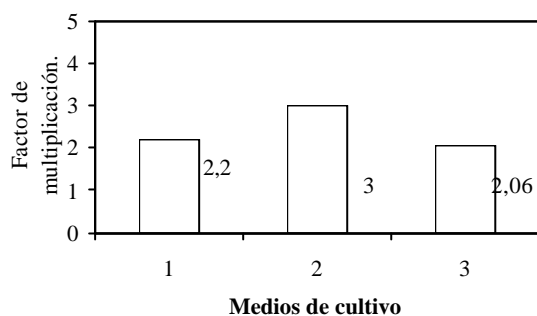


Figura 41. Respuesta de los callos embriogénicos al cultivo en SIT con diferentes combinaciones hormonales. El factor de multiplicación de obtiene: Incremento en peso fresco en 4 semanas /peso fresco inicial. **1.** 0.1mg/l 2.4D y 0.5mg/l BAP, **2.** 0.1mg/l 2.4D y 2mg/l BAP **3.** 0.1mg/l ANA y 2mg/l BAP

El medio 2, con 2mg/l de BAP y 0,1 de ANA, resultó ser el más favorable para una multiplicación correcta. El material fue más nodular y la multiplicación más rápida. En los medios 1 y 3 (0,1mg/l de 2,4D con 0,5 y 2mg/l de BAP respectivamente) el crecimiento fue más lento y hubo mayor grado de diferenciación.

1. 0.1mg/l 2.4D y 0.5mg/l BAP
2. 0.1mg/l 2.4D y 2mg/l BAP
3. 0.1mg/l ANA y 2mg/l BAP

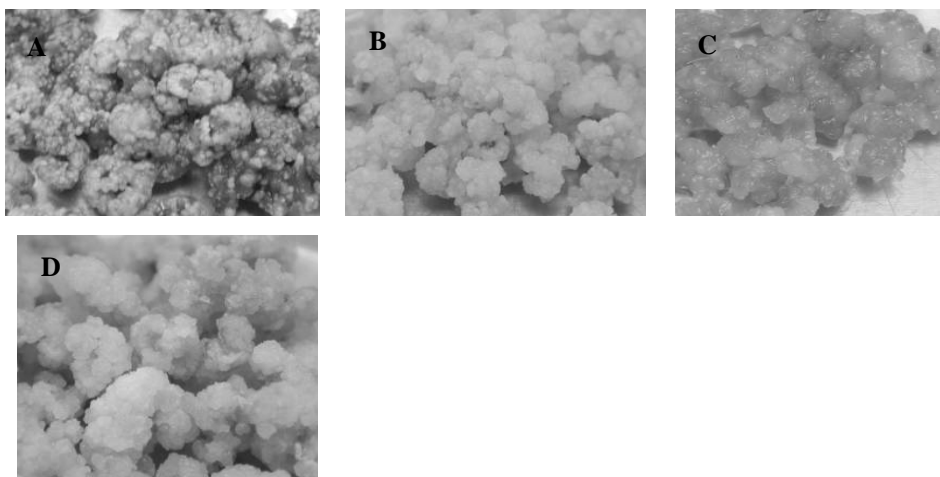


Figura 42. Comparación entre callos embriogénicos creciendo en un medio sin PVP, A, y en un medio con 0.5mg/l de PVP, B. Comparación entre callos embriogénicos creciendo en medio sin PAC, C, y en medio con 1mg/l de PAC, D.

3.1.2.3 Inducción de embriones dipolares en sistemas de inmersión temporal

En el primer ensayo de polaridad se empleó ½ MS en combinación con dosis diferentes de BAP. El resultado fue una mayor tasa de diferenciación y un crecimiento más lento.

Los resultados de este ensayo se representan en la Figura 43.

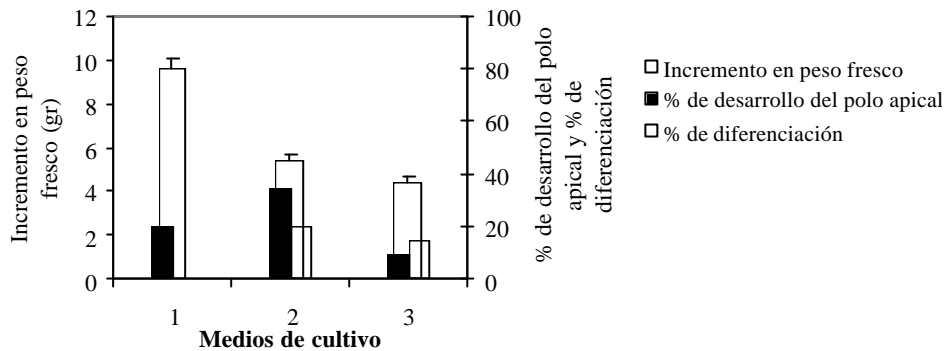


Figura 43. Respuesta al primer ensayo de maduración de los embriones en SIT.

1. 2mg/l BAP + 0,05mg/l ANA
2. 2mg/l BAP + 0,1mg/l 2,4D
3. 4mg/l BAP + 0,1mg/l 2,4D

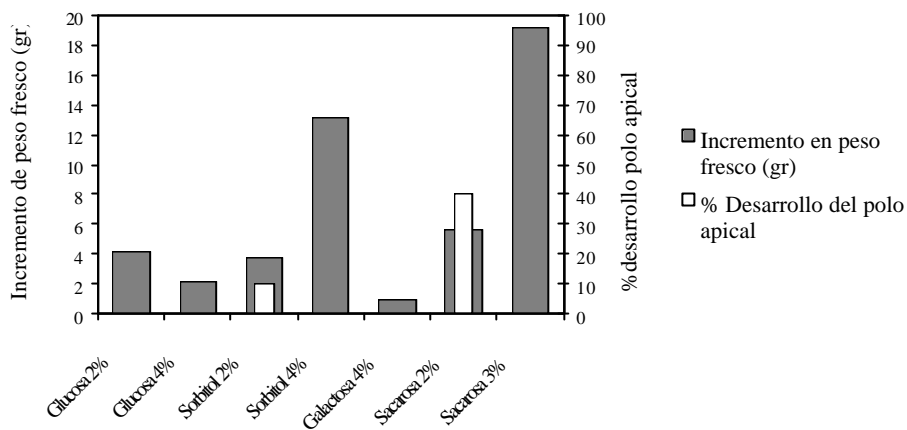
El desarrollo de embriones dipolares fue mayor en un medio con 2mg/l de BAP (en los medios 1 y 2) (Figura 45A) que en el medio con 4mg/l de BAP (medio 3). La diferenciación se apreció en el medio con BAP y 2,4D (medio 2).

Añadiendo ácido jasmónico al medio 2 no se apreciaron diferencias importantes. Los explantes aparecían algo mas diferenciados (nódulos de mayor tamaño) pero no hubo inducción de polaridad en el embrión. Respecto al medio base sin aporte hormonal externo, aunque los explantes no mueren, se comprobó que el crecimiento era mucho más lento.

3.1.2.4 Ensayo con diferentes fuentes de carbono

Para inducir la polaridad en los callos embriogénicos se probaron alternativas en la fuente de carbono en diferentes concentraciones (glucosa y sorbitol al 2 y 4%; galactosa al 4% y sacarosa al 2 y 3%). En todo caso el crecimiento fue mejor en el control (3% de sacarosa) aunque la polaridad aumentó considerablemente al disminuir la concentración

de sacarosa en el medio. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 44. Los datos se detallan en el anexo de datos.



No se representan barras de error puesto que se empleó una única réplica por tratamiento

Figura 44. Efecto de las diferentes fuentes de carbono en el crecimiento y desarrollo de los embriones en SIT.

El desarrollo del polo apical de los embriones en un medio con 2% de sacarosa fue muy superior al resto de variantes ensayadas. Con respecto a la textura de los callos tras el tratamiento, únicamente en los casos sorbitol 2% y las dos dosis empleadas de sacarosa, los callos se mantuvieron nodulares (Figura 45B). En el resto de tratamientos estos aparecieron hiperhidratados (concentraciones inferiores de glucosa y glicerol y 4% de sorbitol) o endurecidos (concentraciones superiores de glicerol, glucosa y galactosa).

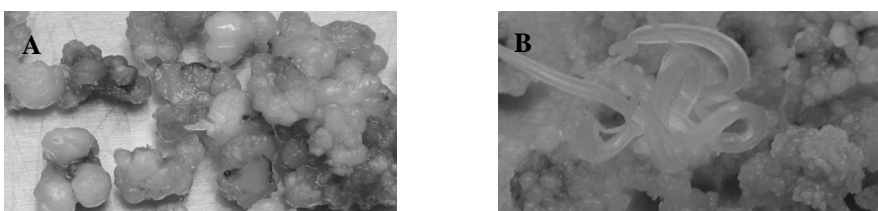


Figura 45. Material creciendo en sistemas de inmersión temporal. A, diferenciación de los nódulos en el primer ensayo de diferenciación en el medio 2. B, explantes con desarrollo de brotes con 2% de sacarosa

Comparando los rendimientos obtenidos en los SIT con los obtenidos por cultivo en medio sólido se apreció un porcentaje de crecimiento muy superior en los sistemas de inmersión temporal (Figura 46).

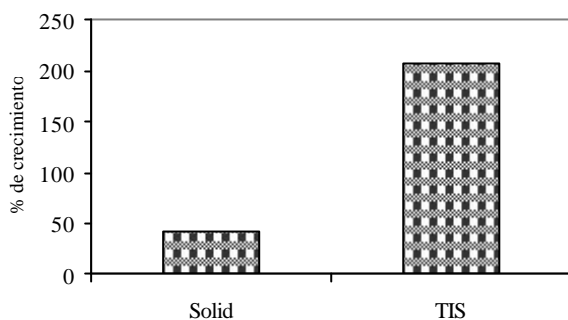
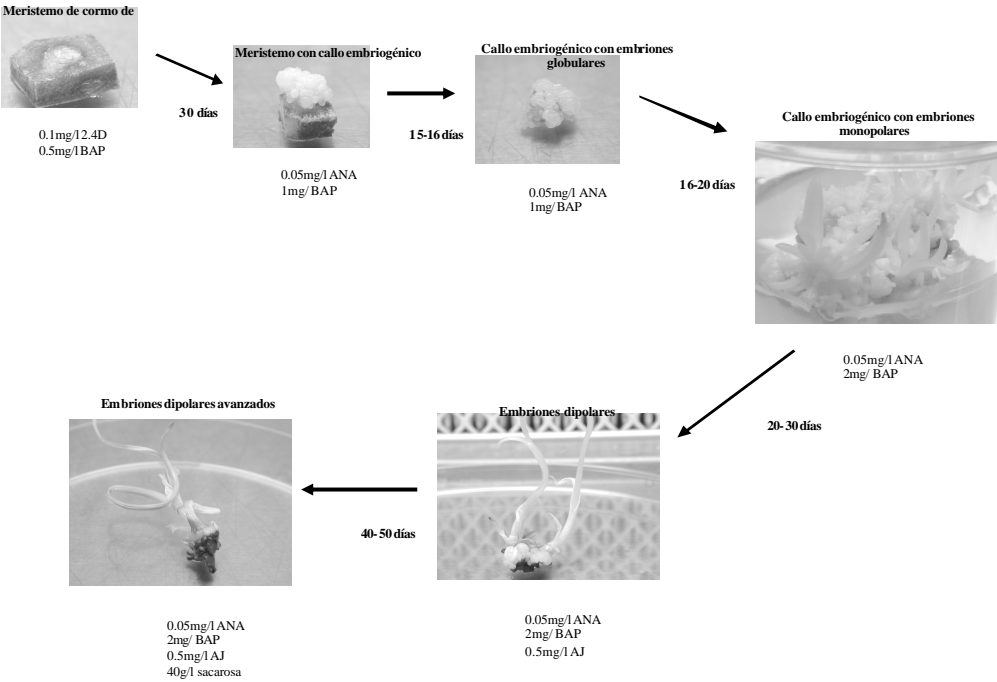


Figura 46. Porcentaje de crecimiento de los callos embriogénicos en los dos tipos de sistemas. El porcentaje de crecimiento se calcula, peso final menos peso inicial/ peso inicial (pf-po/po).

En el esquema siguiente se representan en síntesis los pasos seguidos en el cultivo desde la inducción de los callos embriogénicos hasta la formación de embriones dipolares avanzados

Esquema del proceso de embriogénesis somática en azafrán



3.1.4. Alteraciones del proceso embriogénico encontradas en el cultivo.

Dentro del estudio de los fenómenos de diferenciación de callos embriogénicos de azafrán se detectaron numerosas alteraciones a lo largo del proceso. Estas alteraciones en la morfogénesis pueden ser debidas a numerosos factores. El empleo de hormonas sobre una línea de tejidos en crecimiento de forma continuada puede acarrear la aparición de mutaciones puntuales, e incluso mutaciones que se hereden de unas generaciones a otras. En nuestro caso el empleo de 2,4D por un lado y de TDZ por otro pueden haber afectado al patrón de desarrollo del tejido originando ciertas mutaciones.

En la Figura 47A se apreciaba un fenómeno de tuberización del callo de azafrán, a partir de estos tubérculos se obtuvo una línea, En este caso se trata de una alteración que es capaz de pasar de una generación a otra. Tras varios subcultivos se originó finalmente una línea de raíz de la que hemos llegado a obtener algunos cormos completos. Esta línea de raíz se mantiene en el laboratorio y mantiene su alteración generación tras generación.

En la Figura 47B el callo fue originando un engrosamiento (un futuro cormo) pero al mismo tiempo se despertó el programa de desarrollo floral. No se llegó a formar una flor, aunque sí se aprecian los estigmas. Cada uno de los nódulos que aparecen diferenciándose dará lugar a un estigma de azafrán, no se trata por tanto de una flor de azafrán normal, sino de una mutación que en este caso no se ha mantenido a lo largo del tiempo. Independizando las dos partes del explante, la parte superior origina los estigmas y la parte inferior terminó desarrollándose en un cormo completo.

En la Figura 47C, el desarrollo floral fue casi completo aunque como en el caso anterior la flor es anormal, hay seis estigmas y fusión de los tépalos en dos únicas estructuras.

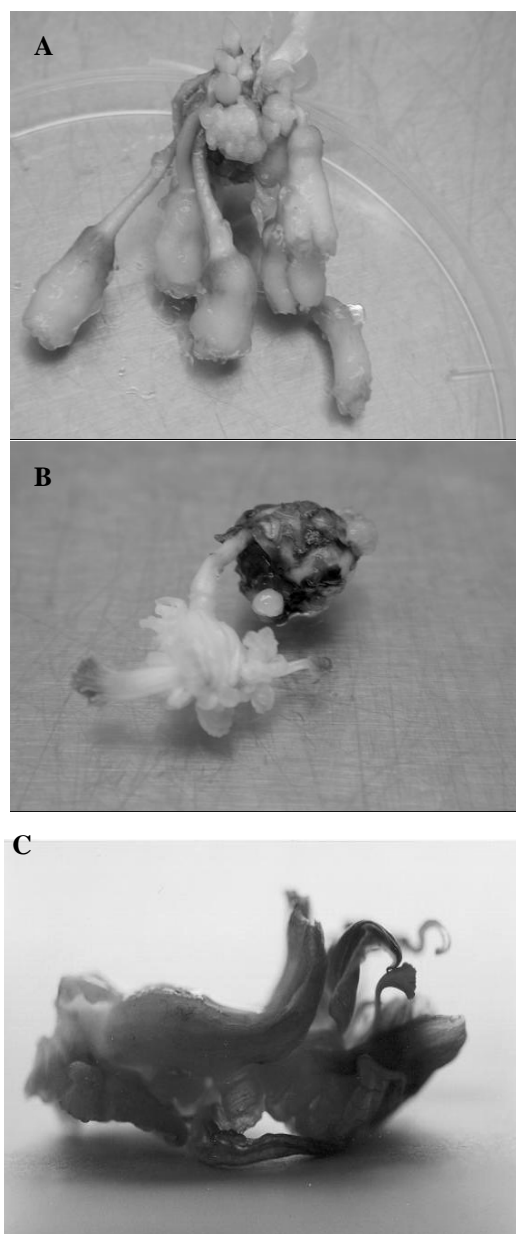


Figura 47. A, Tuberización obtenida a partir de callos embriogénicos de azafrán. B y C desarrollo anormal del programa floral.

3.2. MORFOLOGÍA DEL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AZAFRÁN

Paralelamente al establecimiento del protocolo de embriogénesis somática en azafrán se realizó un estudio histológico y morfológico de las diferentes fases de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán. Las estructuras fueron observadas microscópicamente al inicio de los cultivo y en subcultivos subsecuentes y se procedió a su estudio histológico y ultraestructural. Este estudio tuvo como objeto caracterizar las estructuras encontradas en las sucesivas etapas de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán.

3.2.1. Estadío 0: formación de las masas proembriogénicas

En estudios realizados mediante microscopia óptica, microscopia electrónica y microscopia electrónica de barrido de las primeras fases de formación de callo se aprecian claramente nódulos embriogénicos, que originaran embriones. En la Figura 48 se muestran los nódulos embriogénicos a diferentes aumentos. La imagen en microscopia electrónica de barrido muestra, en superficie, los diferentes nódulos que conforman el callo embriogénico (48A). En la Figura 48B la flechas señalan las regiones meristemáticas de crecimiento activo, en la vista a microscopía óptica se aprecian como conjuntos de células en numero variable. Estas células se muestran en detalle mediante microscopía electrónica de transmisión en la Figura 48C, donde podemos diferenciar la células con crecimiento más activo (48C1) de las células periféricas de las zonas de transición a tejido no embriogénico (48C2). Los callos se obtuvieron a partir de secciones de meristemos creciendo en medio MS completo con 30g/l de sacarosa 0,5mg/l de BAP y 0,1 mg/l de 2.4D. Los nódulos embriogénicos aparecen al cabo de una o dos semanas en cultivo.

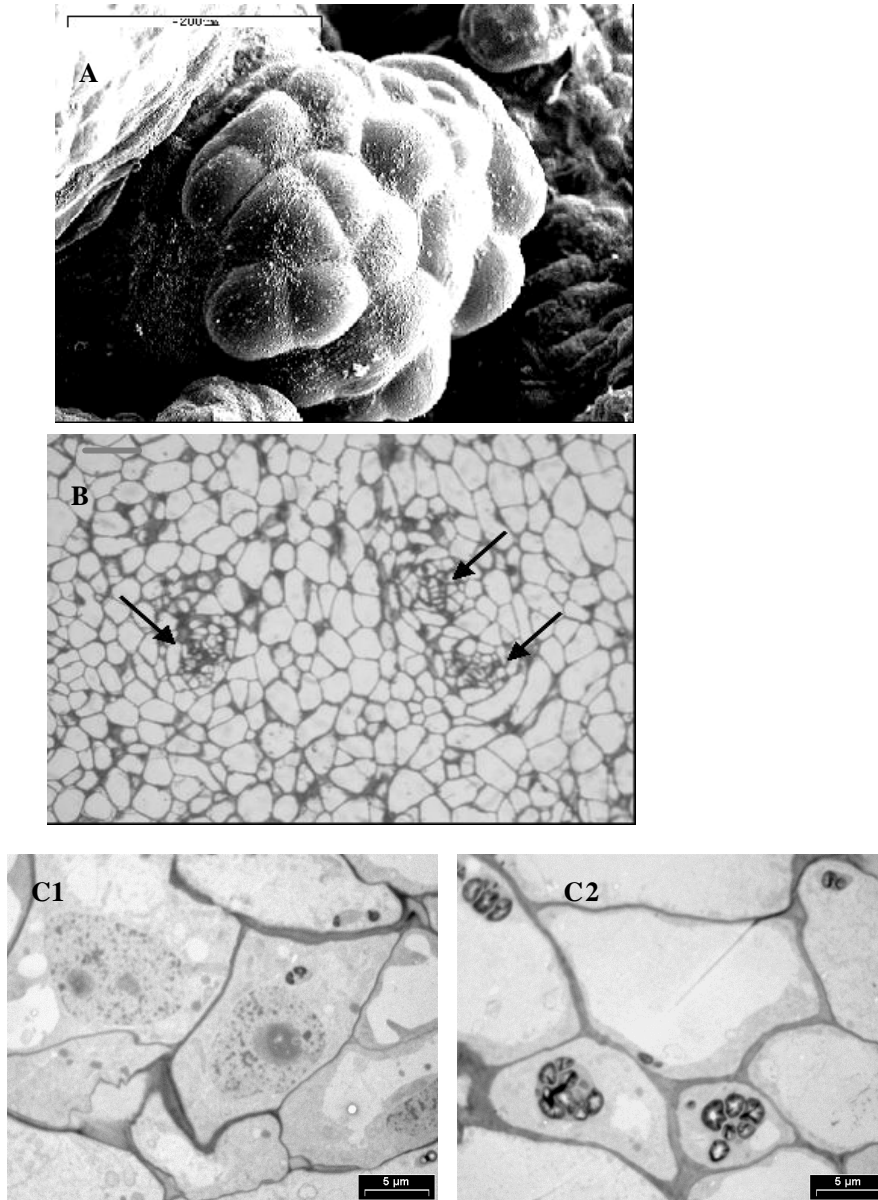


Figura 48. A, Micrografía electrónica de un callo embriogénico, mostrando un embrión proglobular. B, Micrografía óptica de un corte de callo en fase de formación de los nódulos, las flechas señalan los nódulos embriogénicos, la barra representa 400 micras. C, micrografía electrónica de las células que conforman los nódulos embriogénicos (C1) y de la región de transición entre zonas embriogénicas y no embriogénicas (C2).

3.2.2. *Estadio 1: estadio globular*

Con el desarrollo de las estructuras embriogénicas transcurridas dos o tres semanas en cultivo en medio ANA1 (1mg/l de BAP y 0.05mg/l de ANA) comienzan a diferenciarse los embriones globulares como estructuras monopolares (Figura 49A, B y D). La microscopia de barrido o scanning muestra la morfología externa de los embriones somáticos en estadio 1 (Figura 51). Son estructuras redondeadas (globulares), el callo está formado casi en su totalidad por este tipo de estructuras.

Las secciones de los nódulos a microscopia óptica muestran tejido embriogénico (TE) con agrupación en centros generativos (Figura 50A), son regiones de crecimiento muy activo.

3.2.3. *Estadio 2: estadio monopolar*

Los embriones continúan su desarrollo y en 2-4 semanas comienza a emerger el polo apical, de embriones en estadio 2 (Figura 49B y C y Figura 52). El desarrollo de los embriones es muy asincrónico por lo que el polo apical aparece en un primer momento en parte de los nódulos embriogénicos que conforman la masa del callo. En la Figura 50B se aprecia el desarrollo de varios de estos embriones monopolares (material creciendo en medio ANA2 (2mg/l BAP y 0.05mg/l de ANA)).

3.2.4. *Estadio 3: estadio dipolar*

Los embriones crecen a lo largo de 3 o 4 semanas, este tiempo es variable según la naturaleza del explante, en medio ANA2 más 0,5mg/l de AJ. Cuando el polo apical alcanza un tamaño medio comienza el engrosamiento en la base y se definen los dos polos del embrión, polo apical y polo radicular (Figura 49C y D y Figura 50D). En este momento el embrión pasa a estadio 3 y al igual que en el paso de estadio 1 a estadio 2 este paso no es sincrónico sino que sucede en parte de los nódulos en estadio 2 que conforman la masa de embriones. Se establece además una lógica competencia que impide la evolución de todos los embriones en estadio 2 al estadio 3.

3.2.5. Estadío 4: plántulas

Este embrión en estadío 3 sigue madurando, se va desarrollando el polo apical, finalmente en 68 semanas una porción muy pequeña de los embriones en estadío 3 originan cormos completos de azafrán, plántulas, embriones en estadío 4 (Figura 49E y F), en un medio en el que se incrementa la concentración de sacarosa a 40g/l. En el embrión en estadío 4 se diferencian claramente los polos apical (PA) y radicular (PR) así como los haces vasculares (CV), Figura 48E.

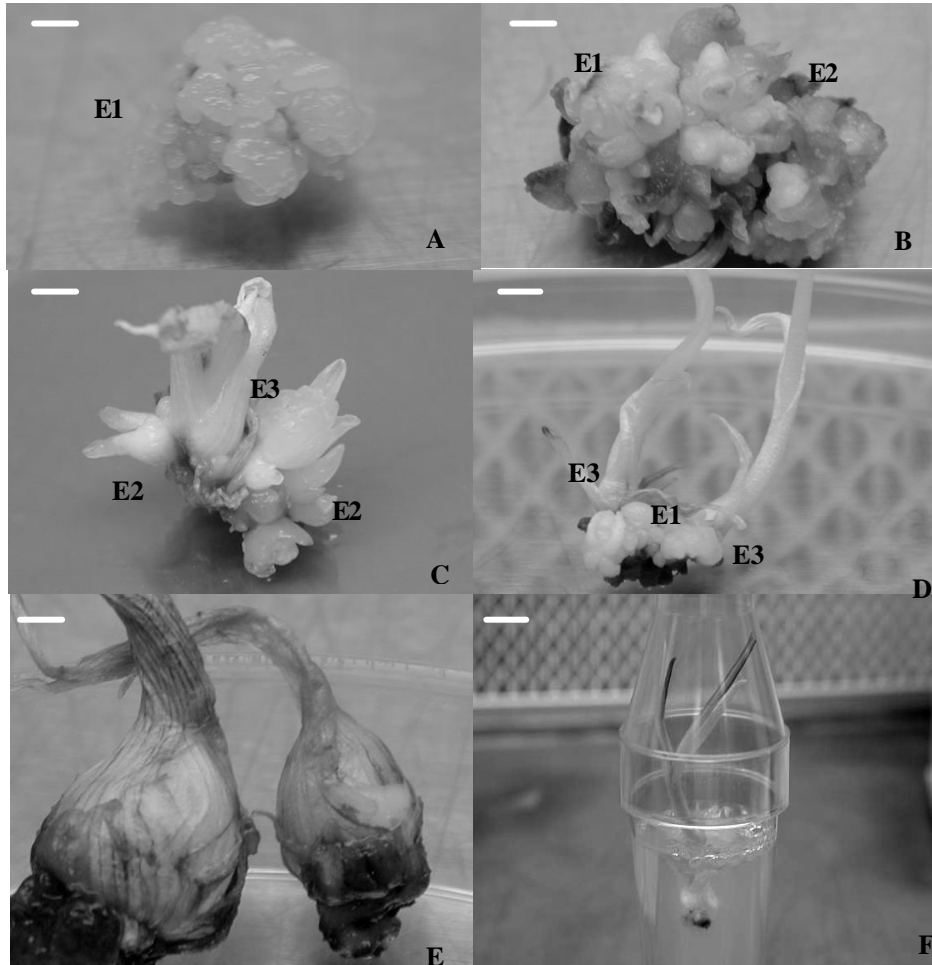


Figura 49 A-F. Embriogénesis somática en azafrán. A, B, C y D, callos embriogénicos con varios estadíos de desarrollo (E1, globular, E2, monopolar, E3, dipolar). E, Fotografía de un corno desarrollado completamente, embrión en estadío 4. La barra representa 0,5cm. F, fotografía de una plántula, embrión en estadío 4. La barra representa 2cm.

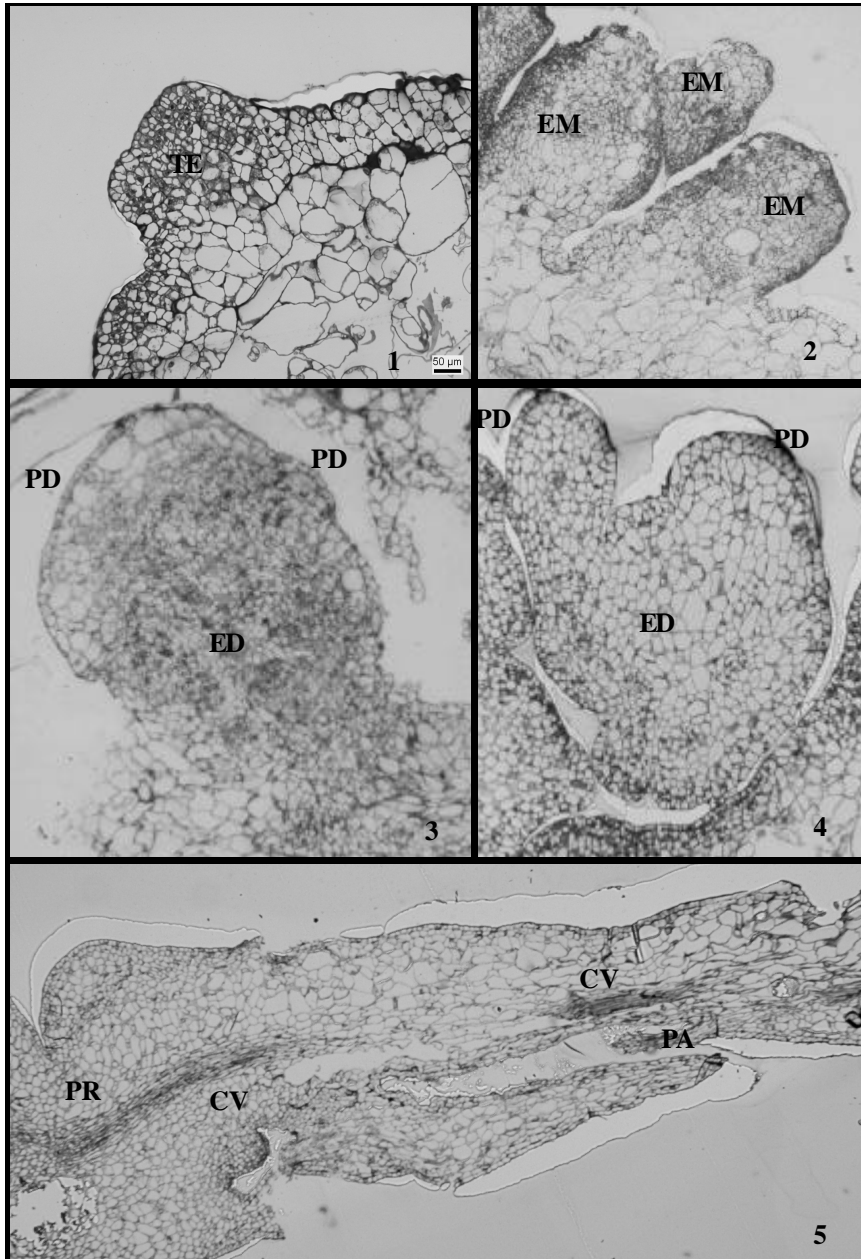


Figura 50. 1-5. Estudio histológico de la embriogénesis somática en azafrán. A, sección de callo nodular con tejido embriogénico (TE). B, embriones somáticos en estadio monopolar (EM). C, embrión somático dipolar (ED) con protodermis diferenciada (PD). D, embrión somático globular aislado (ED). E, embrión somático maduro en sección histológica longitudinal mostrando sus polos apical (PA) y radicular (PR) con conexiones vasculares diferenciadas (CV).

3.3. EVOLUCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE DURANTE EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AZAFRÁN

Se realizó un estudio de las actividades antioxidantes y de indicadores de estrés oxidativo en los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán para relacionar estos procesos con el grado de diferenciación de los embriones. Además se analizaron las diferentes isoformas de la SOD presentes en cada uno de los estadios.

3.3.1. Indicadores de estrés oxidativo

Como indicador de estrés oxidativo se analizaron los niveles de peroxidación lipídica por formación de MDA-TBA (TBARS). En la Figura 51 se presentan los resultados obtenidos, observándose un leve incremento en el estadio 3 (0,429nmol) y un aumento mayor en el estadio 4 (0,644nmol), casi el doble de los valores obtenidos en los estadios iniciales 1 y 2.

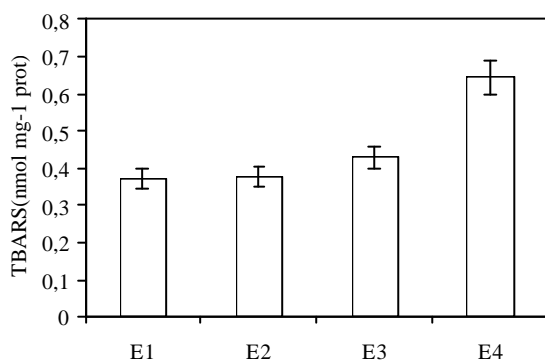


Figura 51. Niveles de peroxidación lipídica en los cuatro estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán. n=3.

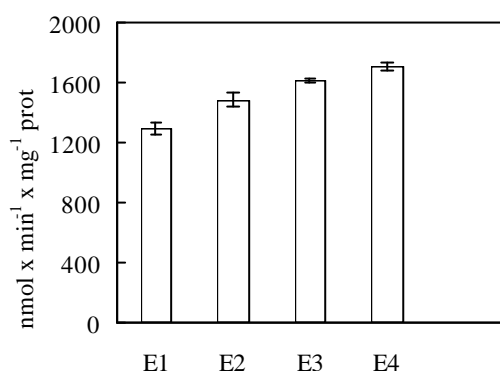
3.3.2. Actividades antioxidantes

Dentro de las actividades enzimáticas antioxidantes se analizaron los niveles de ascorbato peroxidasa (APX) sensible al ácido p-hidroximercuribenzoico (PHMB). Se observó que los niveles de APX sensible a PHMB (peroxidasa clase I) se incrementaban conforme el estadio de desarrollo de los embriones era mayor, siendo el incremento

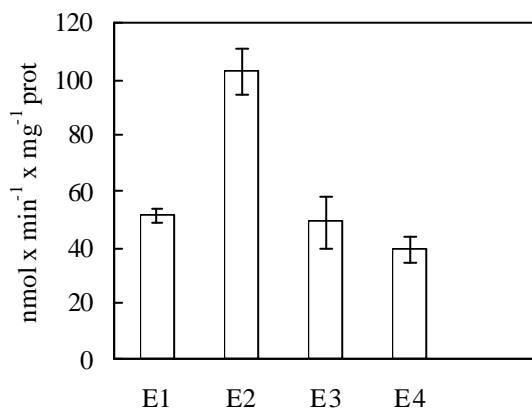
gradual como se puede apreciar en la Figura 52A. La APX insensible a PHMB (peroxidasa clase III) presentó un máximo en el estadio 2, con unos valores que duplicaban a los encontrados en los estadios 1, 3 y 4, entre estos las diferencias no fueron importantes (Figura 52B).

Se estudió por otra parte la actividad catalasa en cada uno de los estadios de desarrollo de los embriones. Esta actividad varía considerablemente de unos estadios a otros. En general se puede decir que en los estadios 1 y 2 fue más baja; prácticamente se cuadruplicó en el estadio 3 y descendió casi a la mitad en el estadio final de desarrollo (Figura 52C).

A)



B)



C)

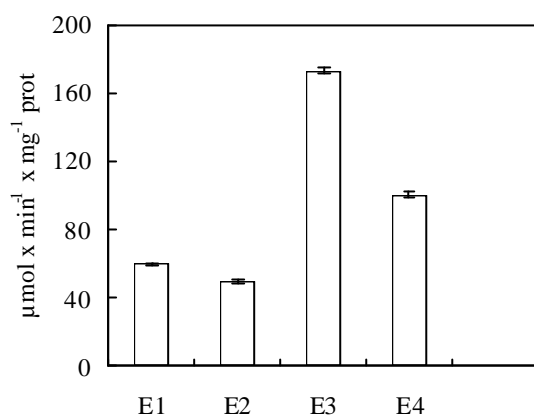
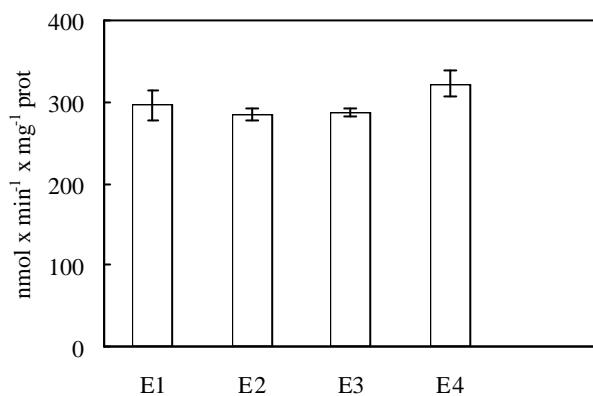


Figura. 52. Ascorbato peroxidasa (APX) sensible a PHMB, A. APX insensible a PHMB, B. y actividad catalasa (CAT), C, durante los estadios de desarrollo de los embriones somáticos.

Los datos obtenidos en la medida de la actividad MDHAR y DHAR se reflejan en la Figura 53, A y B respectivamente. La MDHAR no presentó cambios destacables a lo largo del desarrollo de los embriones. Pese a que la actividad observada fue mayor en los estadios 1 y 4 que en los estadios 2 y 3 las diferencias fueron muy pequeñas.

La actividad de la DHAR presentó valores mucho menores (cuatro veces inferiores a los de MDHAR), además se apreciaron diferencias importantes entre los diferentes estadios de desarrollo, en el estadio 3 la actividad DHAR es el doble que en los estadios 1, 2 y 4.

A)



B)

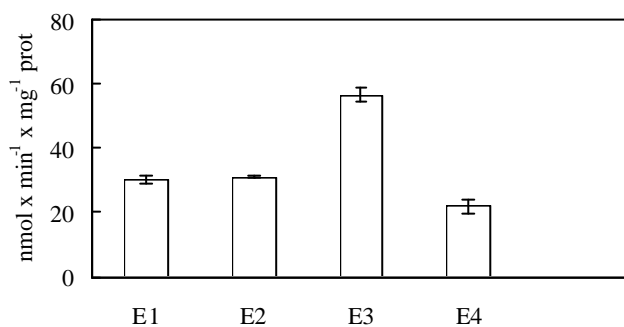


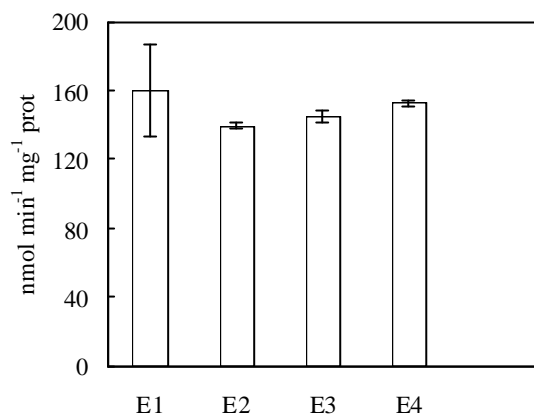
Figura 53. Actividades ácido monodeshidroascórbico reductasa (MDHAR), A y ácido deshidroascórbico reductasa (DHAR), B, medidas en los cuatro estadios de desarrollo de los embriones somáticos.

Por último se determinaron las actividades enzimáticas de la GR y SOD en extractos procedentes de los cuatro estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán, los datos obtenidos se reflejan en la Figura 54A y B para GR y SOD respectivamente. La GR presentó un patrón de actividad constante a lo largo del desarrollo. Parece ser mayor en el estadio primero y cuatro pero con diferencias muy pequeñas respecto a los

estadios intermedios (además en el estadio 1 los valores de las muestras analizadas variaron en un rango amplio).

Por otro lado la actividad SOD fue mayor en los estadios 2 y 3, fundamentalmente en el 2 donde duplicaron a los valores.

A)



B)

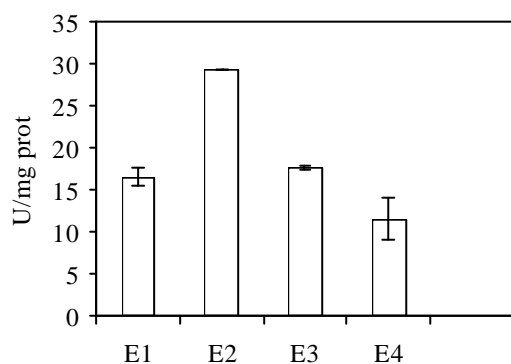


Figura 54. Actividades enzimáticas de la glutatión reductasa (GR), A y superóxido dismutasa (SOD), B, medidas a lo largo del desarrollo de los embriones (E1-E4).

3.3.3. Isoformas de la actividad SOD

Las isoformas SOD presentes en los cuatro estadios de desarrollo de los embriones de azafrán se muestran en la Figura 55. Se encontraron dos isoformas MnSOD y cinco Cu, ZnSOD, (Figura 55A). La presencia de isoformas MnSOD fue aumentando a lo largo del desarrollo de los embriones somáticos como se aprecia en la Figura 55A y más claramente en la Figura 55B, donde el máximo valor para el conjunto de las isoformas Mn-SOD correspondía al estadio 4. Las isoformas de Cu, ZnSOD disminuyeron a lo largo del desarrollo de los embriones como se aprecia en las Figuras 55A y B, en la 55B se aprecia un máximo en el conjunto de las isoformas Cu, ZnSOD en el estadio 1. Comparando los dos tipos de isoformas analizadas se observó que los niveles de Cu, ZnSOD eran superiores a los de MnSOD en todos los estadios

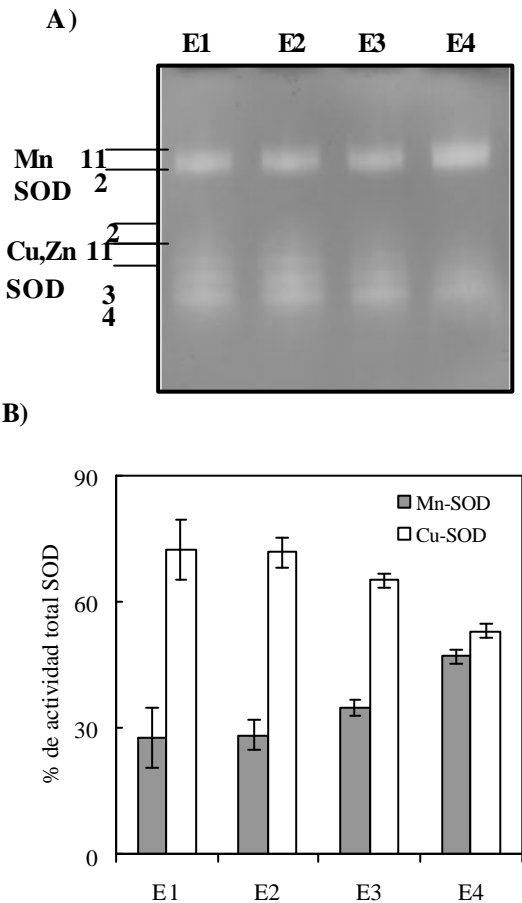


Figura 55. Isoformas de la SOD detectadas en los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán, A. Variación de la actividad de las isoformas Mn-SOD y Cu-SOD en los cuatro estadios, B.

3.4. NIVELES DE POLIAMINAS EN RELACIÓN CON LOS DIFERENTES ESTADÍOS DE DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE AZAFRÁN

Con el objeto de analizar el papel de las poliaminas (PAs) durante el proceso de embriogénesis somática del azafrán se obtuvo material vegetal procedente de cada uno de los cuatro estadios definidos en el desarrollo de los embriones somáticos de azafrán y en ellos se buscó la presencia de cinco PAs (diaminopropano, putrescina, cadaverina, espermidina y espermina), en las cuatro fracciones que representan distintos estados fisiológicos de estos compuestos: libres, conjugadas solubles en ácido y conjugadas insolubles en ácido, éstas a su vez solubles e insolubles en NaOH. De todas ellas sólo se ha podido cuantificar la fracción libre y la conjugada soluble. Las PAs de la fracción conjugada insoluble se detectaron casi siempre en niveles próximos al límite de detección del equipo, por lo que no fue posible cuantificarlas con exactitud.

3.4.1. Efecto del tipo de auxina en los niveles de poliaminas

Dentro del primer estadio de desarrollo de los embriones somáticos se estudiaron dos tipos de muestras, tejidos en crecimiento en medios con dos auxinas diferentes:

ANA1, MS completo, 30g/l de sacarosa, 0,05mg/l ANA y 1mg/l BAP

N, MS completo, 30g/l de sacarosa, 0,1mg/l 2,4D y 0,5mg/l BAP

La inducción de los callos embriogénicos se realizó en presencia de 2,4D pero el mantenimiento de estos en medios con 2,4D a lo largo de los subcultivos podía provocar alteraciones importantes en el tejido (dado que se trata de una auxina muy potente). Para evitar estos problemas una vez estabilizados los callos embriogénicos, el 2,4D fue sustituido por ANA (una auxina menos potente). Se mantuvieron callos embriogénicos de azafrán en medios con los dos tipos de auxinas (ANA y 2,4D) y se analizaron las diferencias.

Los niveles de las cuatro poliaminas analizadas en las dos fracciones cuantificadas se muestran en la Figura 56.

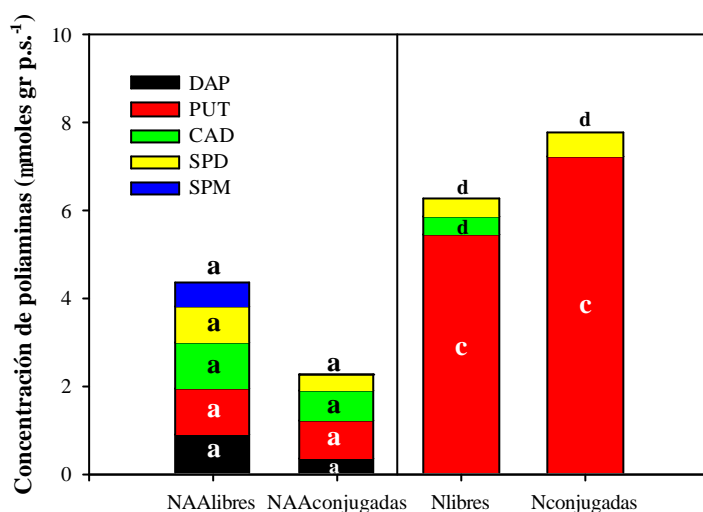


Figura 56. Niveles de las diferentes poliaminas analizadas en E1 con dos diferentes auxinas, 2,4D y ANA.

Letras similares (o el signo +) en cada poliamina indican diferencias no significativas ($\alpha=0.05$) $n=3$.

Las diferencias entre una y otra combinación de reguladores fueron claras. El Dap, la Spm y la Cad conjugada no aparecieron en callos con 2,4D, los niveles de Put en callos cultivados en medio con 2,4D fueron de cinco a siete veces mayores que los encontrados en callos cultivados con ANA. El resto de poliaminas analizadas sin embargo presentaron valores inferiores en callos con 2,4 D que en callos con ANA. Además en el caso de embriones en E1 cultivados con ANA existía un equilibrio entre las cinco poliaminas analizadas en las fracciones libre y conjugada. En los embriones cultivados con 2,4D sin embargo los niveles fueron más variables.

Estas diferencias a nivel de composición en poliaminas se corresponden con diferencias morfológicas entre los callos como se puede apreciar en la Figura 22.

3.4.2. Niveles de poliaminas totales durante la embriogénesis del azafrán

En primer lugar se valoraron los niveles de PAs totales encontrados en cada uno de los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos, desde el callo con nódulos

embriogénicos hasta la formación de cormos. Estos resultados se representan en la Figura 57. Los datos totales se detallan en el anexo de datos.

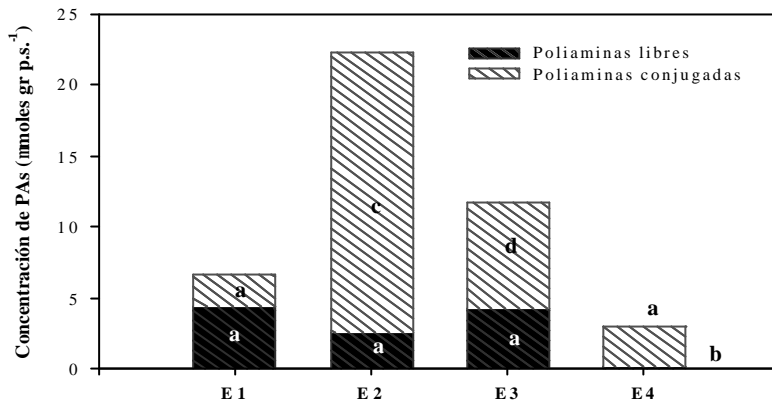


Figura 57. Poliaminas libres y conjugadas en los cuatro estadios diferenciados durante la embriogénesis somática en azafrán.

Letras similares en cada fracción de poliaminas indican diferencias no significativas ($\alpha=0.05$), (n=3)

Los niveles de poliaminas totales variaron significativamente a lo largo del desarrollo de los embriones. Hubo un incremento en más de tres veces del estadio 1 al estadio 2, que coincidía con el inicio del desarrollo del polo apical, posteriormente fueron disminuyendo en los estadios 3 y 4 conforme avanzó la diferenciación de los tejidos. Del conjunto de poliaminas totales se discriminó en primer lugar la porción correspondiente a las fracciones libre y conjugadas solubles (Figura 57).

Los niveles de PA libres y conjugadas fueron similares en el estadio 1 (65% libres y 35% conjugadas solubles), sin embargo en los estadios siguientes los niveles de PA conjugadas fueron superiores a los de PA libres. Las diferencias más patentes se encontraron en los estadios 2 y 4 (89% conjugadas solubles frente a 11% libres en el estadio 2 y 92% conjugadas solubles frente a 8% libres en el estadio 4). En el estadio 3 el porcentaje de PA conjugadas fue superior pero con diferencias similares a las descritas en el estadio 1 (37% libres frente a 63% conjugadas).

Con respecto a la evolución de cada fracción a lo largo de la embriogénesis, se observó que las PA libres se mantuvieron durante los tres primeros estadíos en valores similares, sin variación estadísticamente significativa, mientras que los principales cambios afectaron a los niveles de PA conjugadas. En el estadío 2 la cantidad total de PA conjugadas fue de dos a cuatro veces mayor que la cantidad de PA libres. En el E3 los niveles de PA conjugadas se redujeron nuevamente y en E4 las PA libres disminuyeron drásticamente y la concentración de PA conjugadas se redujo hasta situarse en valores similares a los de E1.

3.4.3. Poliaminas libres en los cuatro estadíos

Considerando cada una de las poliaminas estudiadas por separado los resultados que se obtuvieron en la fracción libre se representan en la Figura 58.

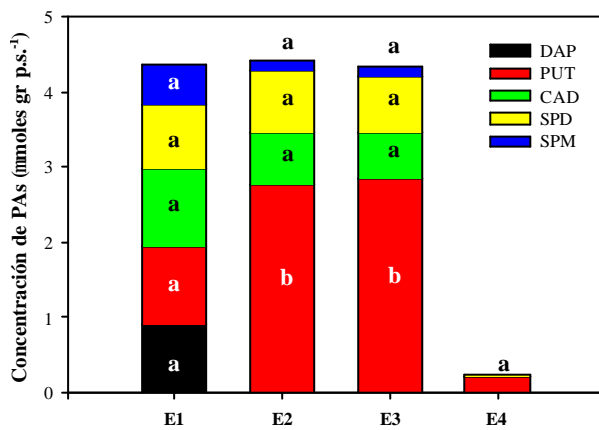


Figura 58. Niveles de cada una de las poliaminas libres analizadas en los cuatro estadíos diferenciados durante la embriogénesis somática en azafrán.

Letras similares en cada poliamina indican diferencias no significativas ($\alpha=0.05$) ($n=3$).

En la Figura 59 se puede apreciar que los principales cambios encontrados en esta fracción afectaron a Dap, Put y Spm. En el estadío 1 hubo un equilibrio entre las cinco poliaminas estudiadas. En E2 y E3 la concentración de Put se triplicó y disminuyó drásticamente en E4. También se encontró Cad, Spd y Spm en todos los estadíos de la

embriogénesis excepto en el E4, en cantidades similares. Dap solo se pudo cuantificar en el estadio 1.

3.4.4. Poliaminas conjugadas en los cuatro estadios

Las poliaminas conjugadas solubles en ácido representan otra fracción fisiológicamente muy activa de estos compuestos. Los resultados relativos a la cuantificación de los niveles de poliaminas conjugadas solubles durante la embriogénesis del azafrán se representan en la Figura 59.

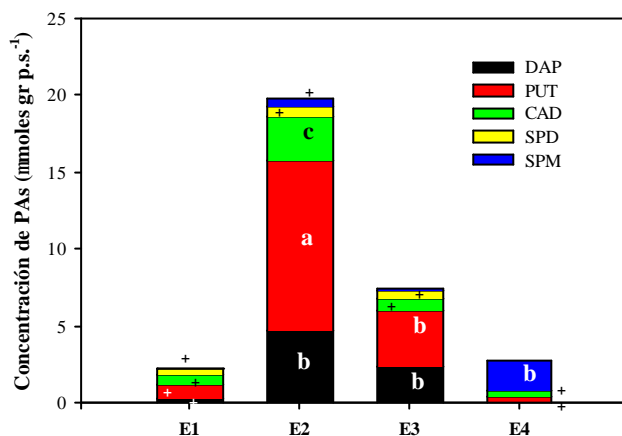


Figura 59. Niveles de cada una de las poliaminas conjugadas analizadas en los cuatro estadios diferenciados durante la embriogénesis somática en azafrán.

Letras similares (o el signo +) en cada poliamina indican diferencias no significativas ($\alpha=0.05$) ($n=3$).

Los niveles de PAs conjugadas totales, como ya hemos comentado, experimentaron cambios cuantitativamente mucho más importantes que los de PAs libres a lo largo del desarrollo de los embriones. En E1 la concentración de PAs conjugadas totales fue muy baja, del orden de $2,5 \mu\text{mol PA gr p.s.}^{-1}$, si bien a pesar de esta baja concentración pudieron ser detectadas las cinco poliaminas analizadas. En el estado siguiente esta fracción experimentó un incremento drástico, llegando a alcanzar los $20 \mu\text{mol PA gr p.s.}^{-1}$, si bien a partir de ese momento disminuyeron ya de forma continua en los siguientes estados. Al igual que en el estudio de la fracción de PAs libres, en este caso fue también Put la poliamina más abundante encontrada en todos los estadios, y la que

sufrió los cambios más importantes. Es de destacar que a diferencia de lo descrito anteriormente, encontramos Dap en forma conjugada hasta el estado III de la embriogénesis. Otro hecho destacable es que Spm se convirtió en la forma conjugada más abundante en el último de los estadíos estudiados.

3.4.5. Relaciones de interés en poliaminas

Se establecieron varias fórmulas para relacionar los diferentes niveles de poliaminas, tanto las relaciones entre las diferentes fracciones como relaciones entre diferentes poliaminas dentro de cada fracción. Los valores de los ratios calculados se presentan en la Tabla 15.

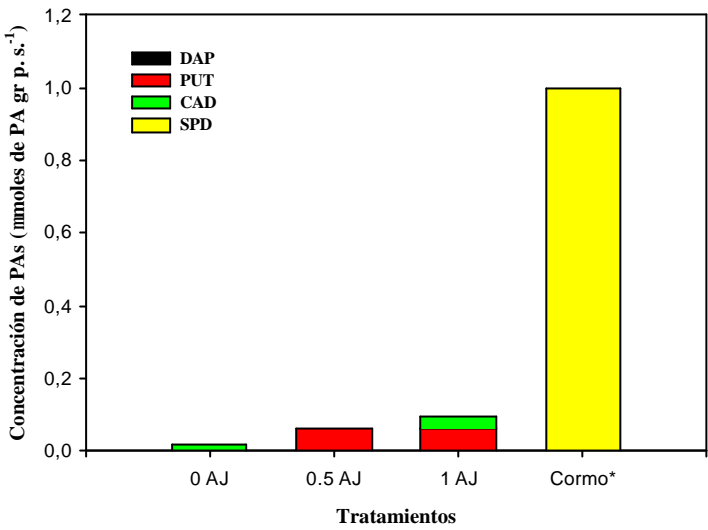
ESTADÍO	PA libres/ PA conjugadas	Put/ (Spd+Spm)		(Dap/ Spd+Spm)x100	
		Libres	Conjugadas	Libres	Conjugadas
E1	0,787	13,97 ± 3,78	12,84 ± 2,74	0	62
E2	0,229	2,57 ± 1,43	8,85 ± 4,48	0	382,14
E3	0,583	3,19 ± 1,23	5,35 ± 5,76	0	336,24
E4	0,205	13,93 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0	0

Tabla 15. Diferentes ratios indicadores en poliaminas de plantas.

3.4.6. Efecto de la concentración de ácido jasmónico en la concentración de PAs

En el estadío 4, periodo en el que se produce la formación del cormo de azafrán, se analizaron tres variantes según el tratamiento con ácido jasmónico. Un control desarrollado en ausencia de regulador y tejidos tratados con 0,5mg/l y 1mg/l de ácido jasmónico. Estas variantes se compararon con los análisis realizados sobre cormos recogidos directamente del campo en fase de dormancia. En la Figura 60 se muestran los resultados con diferentes tratamientos y en cormos recogidos en el medio natural.

A)



B)

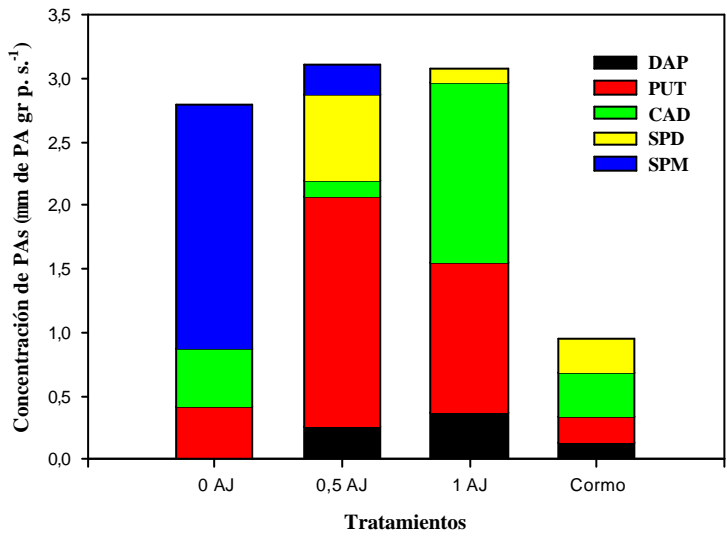


Figura 60. Niveles de las poliaminas analizadas, tanto libres, A, como conjugadas, B, en E4 con diferentes tratamientos y en cormos naturales . (n=3)

Hay que decir en primer lugar que en todos los casos se encontró una elevada heterogeneidad en los análisis, lo que hace que solo se considere una de las réplicas (la más representativa). Por esta circunstancia no se han realizado análisis estadísticos en este apartado. Los niveles de poliaminas conjugadas resultaron superiores en los tratamientos y en el control a los de poliaminas libres. En los cormos, sin embargo, esta diferencia no existe. La adición de AJ en la última fase de la embriogénesis determinó escasas diferencias en la cantidad de PAs conjugadas encontrada bajo las dos concentraciones probadas con respecto al control, pero sí las hubo en la distribución en PAs individuales y también en la cantidad de poliaminas correspondientes a la fracción libre, que se incrementó entre cinco y seis veces como consecuencia de la presencia de AJ. Dap apareció únicamente en forma conjugada en los embriones desarrollados con diferentes dosis de AJ y en los cormos, pero no apareció en el control. Put fue la amina más abundante en todos los casos excepto en el cormo en dormancia. Los niveles de Put se incrementaron en explantes tratados con AJ. La dosis óptima de desarrollo de cormos fue 0,5 mg/l de AJ y que es, además, el valor al cual las dosis de Put encontradas en el tejido fueron mayores. Los niveles de Put en explantes sin AJ control fueron similares a los encontrados en cormos desarrollados de forma natural. Cad se encontró conjugada en muestras sin AJ (cormos *in vitro* y cormos del campo) y tanto libre como conjugada en el resto aunque en concentraciones muy variables. Los niveles de Spm parecían ser mayores en explantes no tratados con AJ, la Spd la encontramos indistintamente en medios con y sin AJ pero en su mayor parte conjugada.

La comparación de los perfiles de poliaminas encontrados en el estado 4, último de los considerados en este estudio, con cormos formados *ex vitro* (Figura 60A y B) pone de manifiesto finalmente algunos hechos destacables. En primer lugar los cormos crecidos en campo tienen un perfil de poliaminas libres constituido por trazas de Put y una concentración apreciable (en torno a $1\mu\text{mol gr p.s.}^{-1}$) de Spm, que difiere completamente del perfil de poliaminas libres encontrado en los cormos en estado 4 de nuestro estudio en el que más del 90% de esta fracción estaba constituida por Put y se apreciaron trazas de Cad y Spd. En cuanto a las conjugadas destaca el hecho de que en cormos crecidos en el campo esta fracción es en torno al 50% más baja que en cormos desarrollados *in vitro*, si bien se mantienen el tipo y concentración relativa de las poliaminas en esa fracción.

3.5. PRIMEROS ENSAYOS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA EN AZAFRÁN

3.5.1. Transformación por biolística

Se ensayaron diversos plásmidos disparados sobre diferentes tejidos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se transformaron callos de meristemo de cormo de azafrán en E1 con las construcciones pBIN-GUS y EM-GUS y cormos de azafrán con EM-GUS (en las condiciones descritas). En el resto de tejidos disparados no se detectó transformación. Tampoco se detectó transformación con pBIN-GFP en ninguno de los tejidos (existió cierto grado de confusión debido a la autofluorescencia de callos y cormos).

La tinción positiva aparece en forma de pequeños puntos coloreados correspondientes a cada una de las partículas de oro que ha penetrado en el tejido (Figura 63). El número de puntos fue mayor a mayor distancia de disparo con las condiciones restantes similares. En la Figura 61 se representa el número medio de puntos de transformación encontrados en callos y cormos de azafrán transformados con los dos vectores, EM-GUS y pBIN-GUS.

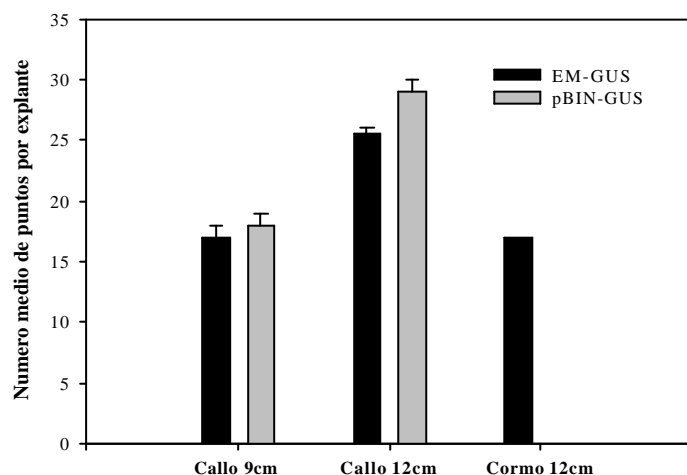


Figura 61. Expresión transitoria en diferentes explantes de azafrán en función del vector empleado y de la distancia de disparo.

Se analizaron tres explantes en cada caso excepto en cormo donde solo se transformó uno de los explantes.

La visualización de este tejido en microscopia óptica (con bajos aumentos) revela que los puntos se corresponden con conjuntos de células transformadas coloreadas (Figura 62). El punteado característico de la transformación transitoria mediante biolística es más claro en callos transformados con pBIN-GUS que en callos y cormos transformados con EM-GUS. En cormos transformados con EM-GUS la mayor parte de los puntos aparecieron en las yemas laterales y meristemo central (regiones de crecimiento más activo) (Figura 64). En la Tabla 16 se representan los diferentes tejidos transformados y las condiciones de disparo que resultaron adecuadas a cada tejido. En todo caso solo fueron positivos disparos realizados con un anillo de dispersión y con micropartículas de oro de 1µm. Ensayos con partículas de mayor tamaño (1,5µm) no ofrecieron buenos resultados.

Distancia (cm)	6cm	9cm	12cm
Presión (psi)			
900	-	-	Callo pBIN- GUS
1100	-	Callo pBIN- GUS	Callo pBIN- GUS EM- GUS
1300	-	-	Cormo y meristemo EM- GUS
1550	-	-	-
1800	-	-	-

Tabla 16. Condiciones de disparo ensayadas para transformación de diferentes tejidos en azafrán.

El resto de tejidos ensayados no se transformaron. Apareció cierto nivel de tinción endógena (debida a actividad de la β -glucuronidasa propia del tejido) que se manifestó como una coloración azul suave y generalizada. Aunque en algunos casos fue más patente en las raíces (Figura 67B y C), hojas, sépalos y capa epidérmica no se detectó actividad alguna. En callos de meristemo de cormo en E1 se detectó un aumento en los niveles de tinción endógena en situaciones de estrés. Cierta nivel de tinción endógena se

apreció en todos los tipos de callos ensayados. En callos de estigma no se encontró actividad endógena de β -glucuronidasa en ningún caso.

Se realizó una RT-PCR para detectar la expresión del gen testigo GUS en los tejidos transformados. Se emplearon tejidos con tres disparos por muestra para aumentar la proporción de células transformadas (ya que es muy baja) y contar así con una cantidad de ARN suficiente para ser detectada por este método. La detección del vector pBIN-GUS en callos transformados fue positiva. Apareció una banda clara de unos 500pb correspondiente a la región del gen de la β -glucuronidasa amplificado (Figura 67) no así en callos transformados con EM-GUS.

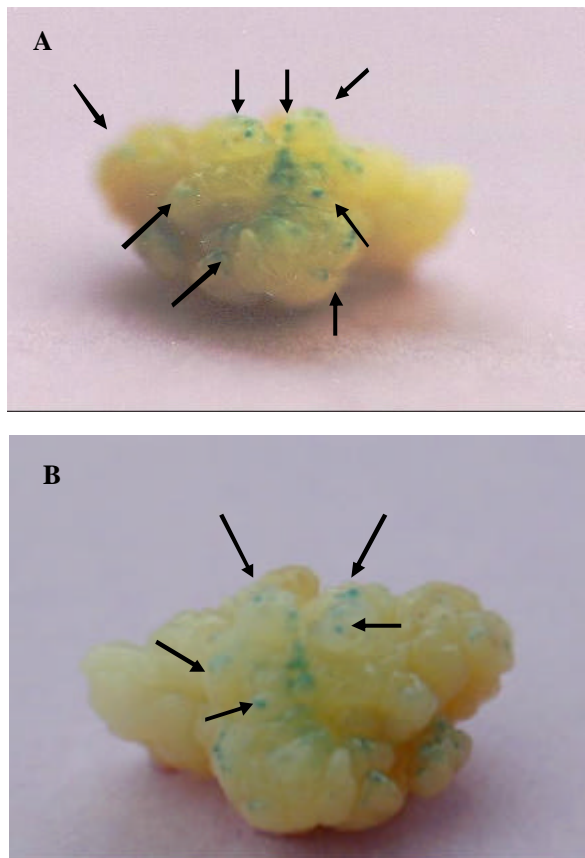


Figura 62. Fotografías de dos callos E1 transformados con la construcción pBIN-GUS, las flechas señalan regiones transformadas con puntos de color azul, A, 12cm de distancia, B, 9cm de distancia.

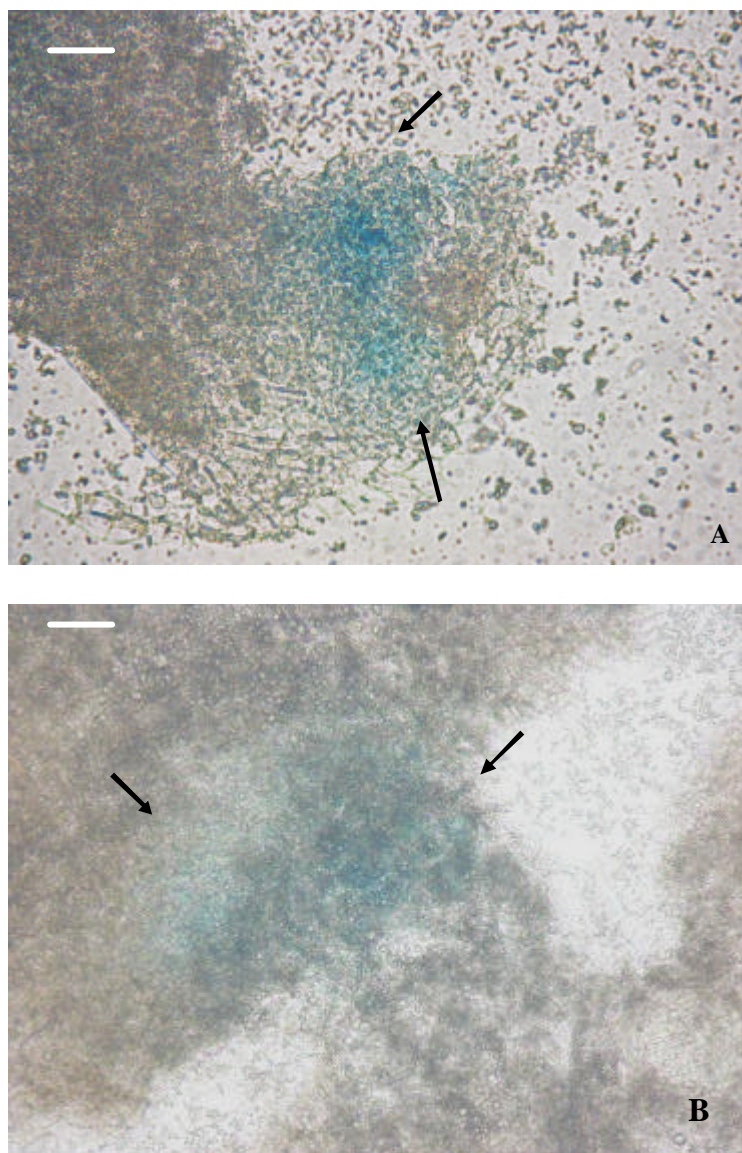


Figura 63. A y B, micrografías ópticas obtenidas mediante scuasch o aplastamiento de zonas de callos con puntos transformados con pBIN-GUS, las flechas señalan los grupos de células coloreadas. La barra representa 400 micras.

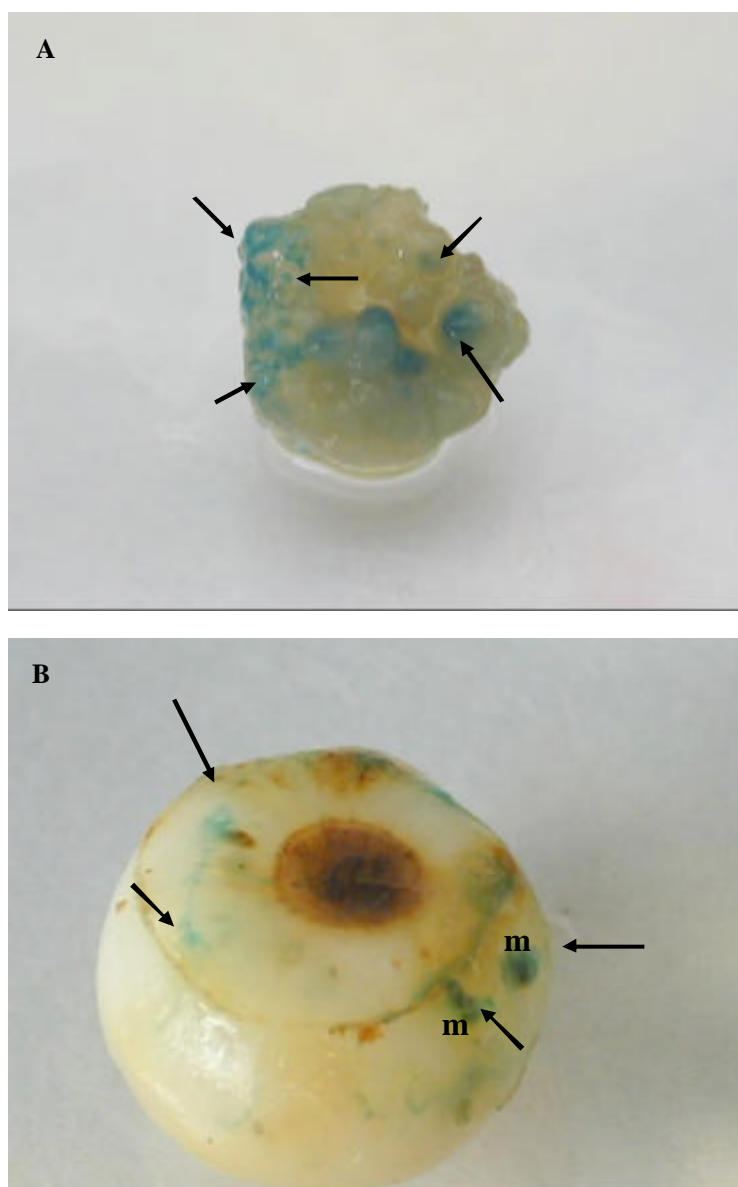


Figura 64. A, callo transformado con EM-GUS, las flechas señalan las regiones con transformación positiva. B, cormo de azafrán transformado con EM-GUS, las flechas señalan también regiones transformadas, m, regiones meristemáticas del cormo (yemas).

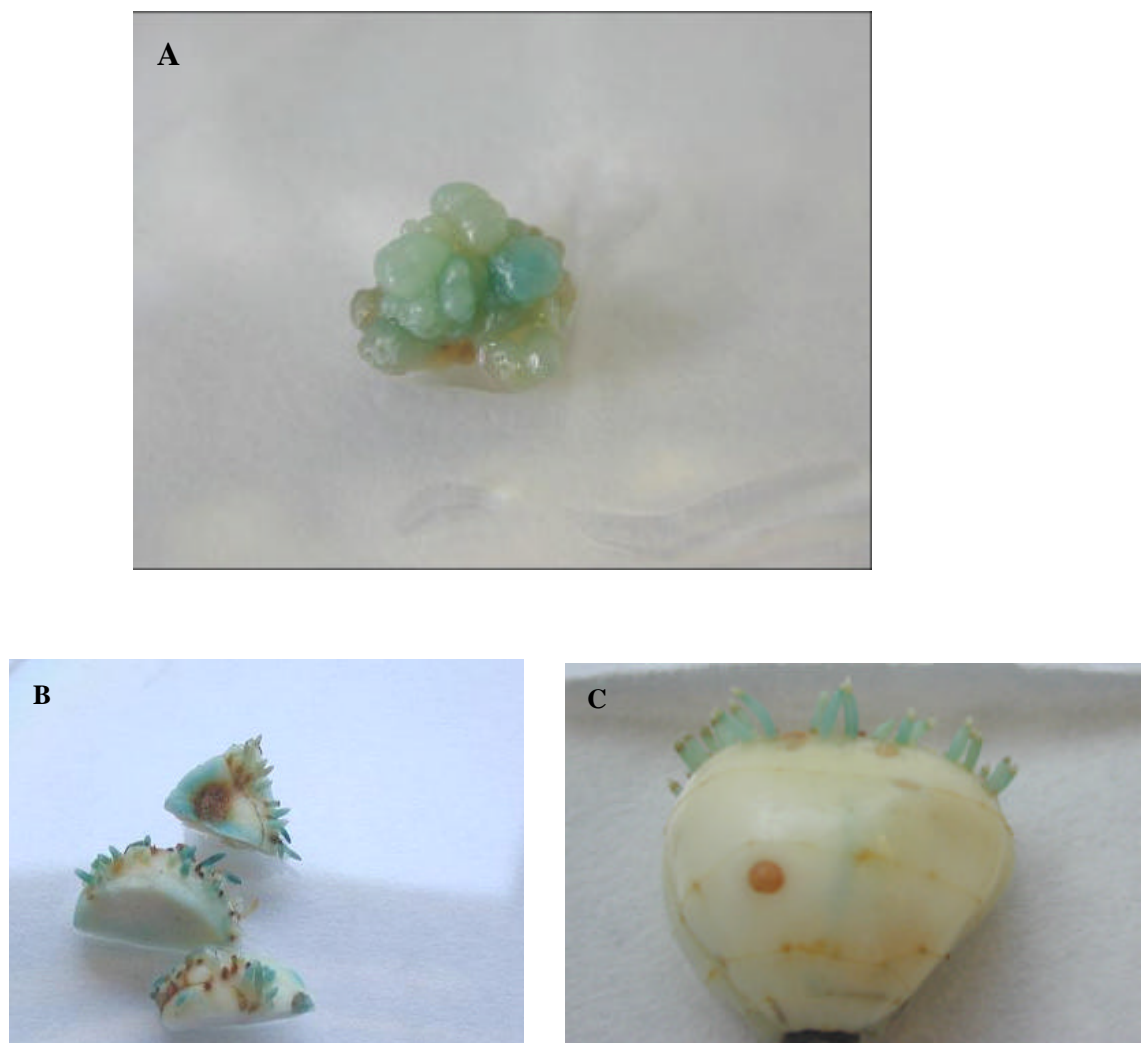


Figura 65. Tinción generalizada debida a la actividad endógena de la β -glucuronidasa en A, callos de meristemos de corno de azafrán, B y C, raicillas del corno de azafrán.

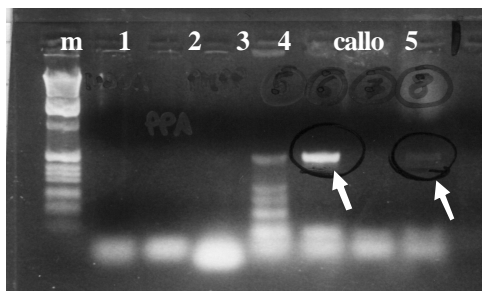


Figura 66. Bandas correspondientes a la β -glucuronidasa (500pb) expresándose en callos E1 transformados, las flechas señalan las bandas positivas. Calles m, marcador de peso molecular, 1, 2, 3 y 5 expresión de diferentes actividades enzimáticas que resultó negativa, y 4 bandas detectadas al amplificar meristemos de corno de azafrán contaminados con los extremos del gen GUS.

3.5.2. Transformación mediada por *Agrobacterium*

La cepa C-36 de *Agrobacterium tumefaciens* se transformó satisfactoriamente con la construcción pBIN-GUS por electroporación. Esta bacteria transformada se empleó en la infección de diferentes tejidos de azafrán.

3.5.2.1. Tejidos infiltrados y sonicados

Se infiltraron y sonicaron con éxito muestras de callo en E1 y E2 y cormos de pequeño tamaño (Figuras 70 y 71). Las regiones de callo transformadas por este método se muestran con una coloración más continua que la que encontrábamos en transformación por biolística.

En la Figura 67 se representa la relación entre la D.O. de crecimiento de *Agrobacterium* y el porcentaje del explante coloreado en los diferentes explantes por las distintas estrategias de infección.

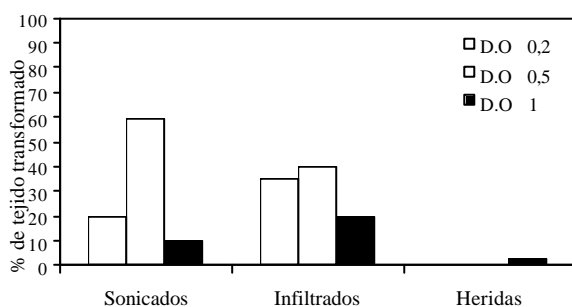


Figura 67. Transformación de callos de azafrán en función de la D.O. del cultivo de *Agrobacterium* y de la estrategia de infección

Se analizó una réplica por valor de D.O. y sistema de infección

Cuando se observaron muestras de estos tejidos transformados con microscopia óptica (con bajos aumentos) se vieron zonas amplias de células transformadas (Figura 70B). La eficiencia de transformación fue mayor empleando cultivo de *Agrobacterium* con D.O. de 0,2 a 0,8. Valores superiores ofrecieron mucha confusión y fue complicado regenerar el tejido posteriormente.

3.5.2.2. Infección por heridas e infección de suspensiones

La infección por heridas ofreció un resultado muy pobre, al igual que la infección y cocultivo de suspensiones. Las suspensiones no crecían en presencia de la bacteria.

Tanto en el caso de callos infiltrados como sonicados de las réplicas no reveladas, se dejó una réplica crecer en un medio de cultivo similar al de procedencia pero con antibiótico de selección, de forma que solo crecieran las zonas transformadas. A lo largo de los subcultivos se fueron eliminando las zonas muertas del callo que correspondían a regiones no transformadas.

Los estudios de regeneración realizados sobre este material se basaron obligatoriamente en el establecimiento de una curva de resistencia del material de forma natural al antibiótico de selección. Se estudió la resistencia natural de los callos de azafrán a diferentes dosis de kanamicina.

En la Figura 68 se muestran los resultados preliminares en los primeros ensayos de supervivencia del material a diferentes dosis de kanamicina.

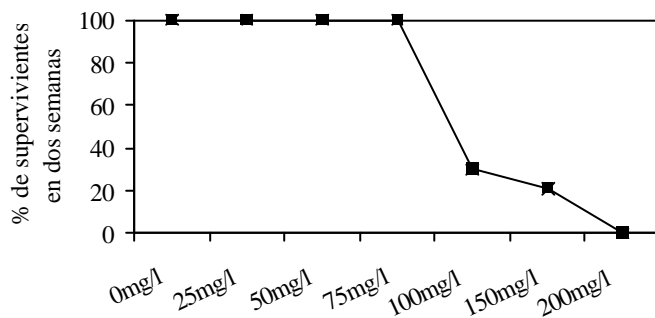


Figura 68. % de supervivencia de los callos con diferentes concentraciones de kanamicina

Se analizaron diez explantes por tratamiento.

A la vista de los resultados de esta figura se deduce que no hay efecto del antibiótico sobre los explantes en concentraciones inferiores a 100mg/l. En estudios posteriores se apreció que la supervivencia dependía mucho del tipo de material empleado en el ensayo.

Se realizó más tarde un estudio de las características de crecimiento de los explantes dentro de cada una de las concentraciones de kanamicina aplicadas. Los valores medios de crecimiento de los callos en diferentes concentraciones de antibiótico se representan en la Figura 69.

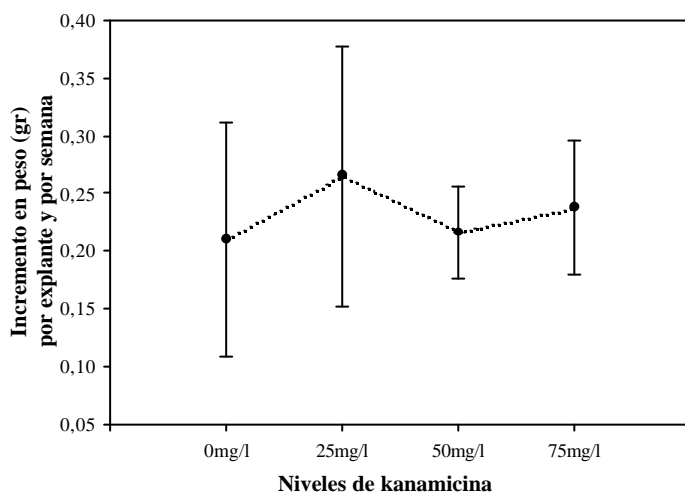


Figura 69. Respuesta de los explantes a las diferentes concentraciones de kanamicina

Se analizaron diez explantes por tratamiento.

Realizando un análisis de varianza se apreció que las diferencias entre los valores representados en la figura no eran significativas ($p=0,56$). En el aspecto exterior hubo algunas diferencias pero no eran determinantes puesto que los callos crecían de manera similar.

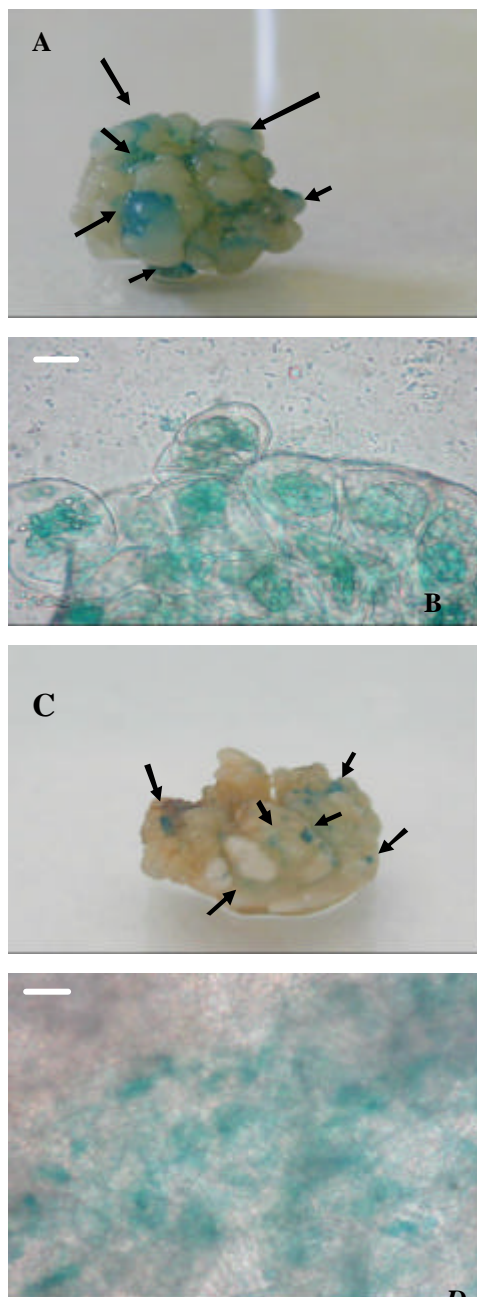


Figura 70. Callos de meristemo de azafrán en E1 infiltrados y sonicados con *Agrobacterium* D.O 0,53 y 0,6 respectivamente. A y B callo infiltrado, las flechas indican zonas amplias donde ha penetrado la bacteria, la barra representa 800 micras. C y D callo sonificado vista de las zonas transformadas (señaladas con flechas), la barra representa 400 micras. Las micrografías ópticas (B y D) se han realizado mediante scuasch o aplastamiento del tejido transformado.

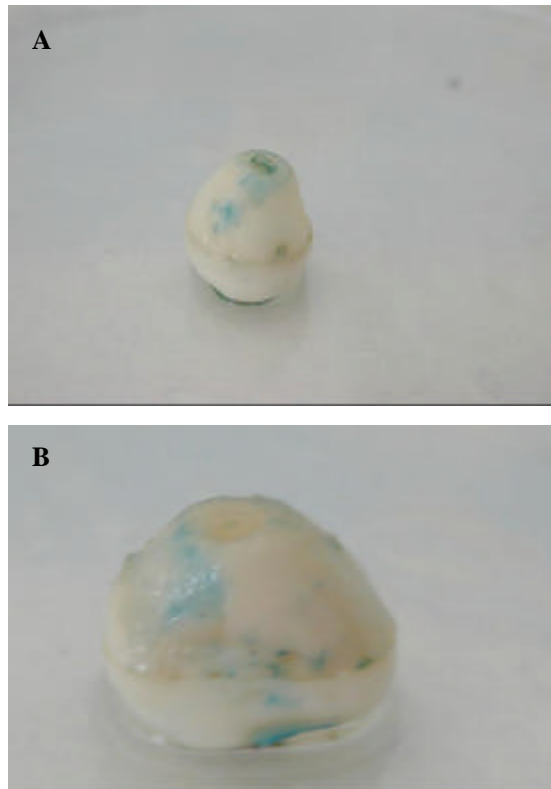


Figura 71. Cormos pequeños de azafrán, infiltrado, A y sonicado, B.

3.5.3. Transformación de protoplastos

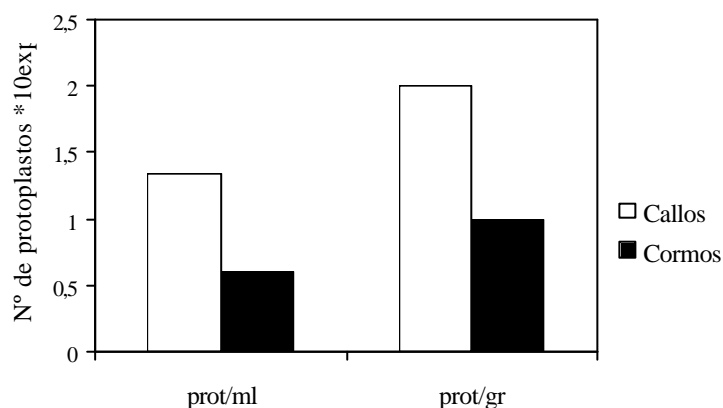
Las frecuencias de transformación de protoplastos fueron muy bajas, y solo en presencia de las construcciones pBIN-GUS y pBIN-GFP. El número de protoplastos obtenidos tras la digestión era pequeño y debieron concentrarse mucho para poder realizar una transformación con un número fiable de células. En la Figura 74A se muestran los rendimientos por gramo de tejido y por ml en la formación de protoplastos en diferentes tejidos.

Se obtuvieron protoplastos a partir de callo de meristemo de cormo en E1 y a partir de cormos de azafrán obtenidos directamente del campo. En estos últimos hubo tasas de contaminación muy elevadas. Además, la presencia de almidón dificultó en gran medida el manejo, transformación y visualización de los transformantes. Solo se logró la transformación de protoplastos de callo. Los protoplastos se observaron redondeados

con la pared celular totalmente digerida y en algunos casos solo podía verse el contenido celular (Figura 73A y B). Al tratarse de protoplastos obtenidos de tejido y no de suspensiones celulares, encontramos además de éstos diversas sustancias derivadas de los restos de tejidos que emitían fluorescencia endógena en coloraciones muy diversas y que llevaron también a confusión en las transformaciones con el vector pBIN-GFP.

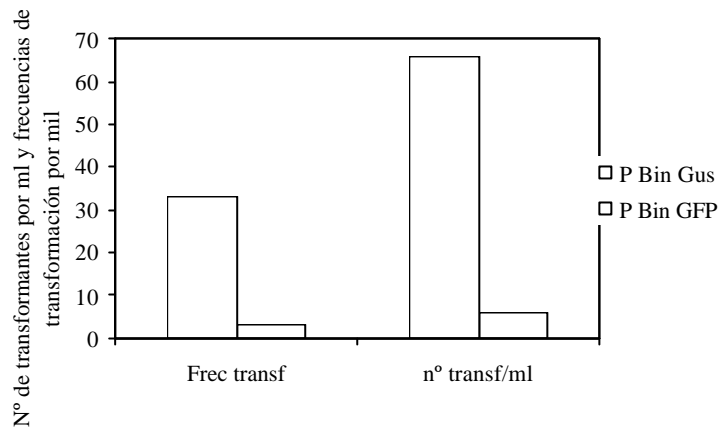
Los protoplastos transformados aparecían aislados, dada la baja frecuencia con la que se obtuvieron y la abundancia de restos de tejidos. Los protoplastos transformados con pBIN-GUS manifestaban una coloración azul en el núcleo celular donde se estaba expresando el gen testigo (Figura 73C). En los protoplastos transformados con la construcción pBIN-GFP solo se apreciaron las regiones en las que se estaba expresando el gen de la *green fluorescent protein* (Figura 73D). En la Figura 72B se muestran las frecuencias de transformación obtenidas con cada uno de los vectores y el número de transformantes por ml.

A)



Se analizaron tres réplicas independientes en cada caso, los valores del error no se representan al ser inferiores al 1% en la escala.

B)



Las frecuencias de transformación de PBin Gus y P Bin GFP se han expresado en porcentajes sobre mil dado que resultaron muy bajas.

Figura 72. A, formación de protoplastos por digestión de la pared celular en callos de corno de azafrán y en cormos obtenidos del medio natural, representación de protoplastos viables tras tinción con DAPI. B, eficacia de transformación de protoplastos de callo de azafrán con los vectores pBIN-GUS y pBIN-GFP.

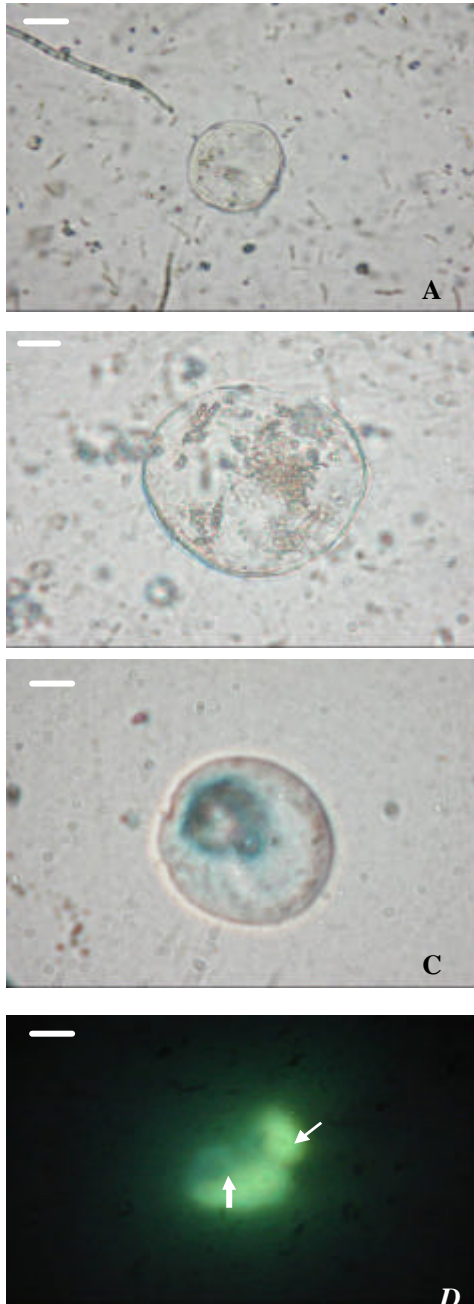


Figura 73. Micrografía óptica de protoplastos obtenidos a partir de tejido de cormo de azafrán, A, y de corno de azafrán, B, en ambos casos la flechas señalan la membrana de la célula, el interior celular y algunos restos celulares, la barra representa 400 micras. C y D, micrografías ópticas de protoplastos transformados, C, con pBIN-GUS y D con pBIN-GFP, las flechas señalan las regiones en las que se esta produciendo expresión del gen testigo. La barra representa 400 micras



4. DISCUSIÓN

4.1. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AZAFRÁN.

El establecimiento de un protocolo de embriogénesis somática mediante cultivo de tejidos en azafrán comprende una serie de fases de cultivo, que se describen a continuación.

Tras la selección de los cormos se procedió al inicio del cultivo. En el presente estudio los callos embriogénicos se inducen empleando como auxina el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D). Este regulador del crecimiento es muy potente y promueve activamente la división celular, pero es necesario retirarlo para permitir la diferenciación de los embriones (Bhaskaran y Smith, 1990). Dodeman y col. (1997) describieron una situación similar en el cultivo de suspensiones embriogénicas de zanahoria (*Daucus carota* L.).

El rendimiento en la etapa de multiplicación de callos embriogénicos (segunda etapa tras el establecimiento del cultivo) en el presente estudio se mejoró considerablemente cambiando el tipo de auxina. El 2,4 D fue sustituido por ácido naftalenacético (ANA) y se incrementó la concentración de citoquinina (bencilaminopurina, BAP). El ANA además de incorporarse al medio de cultivo en menor concentración que el 2,4D, es un regulador menos potente. Este cambio disminuye la relación auxina/citoquinina y favorece el correcto desarrollo de los embriones somáticos (Fei y col., 2002). El 2,4 D en una primera etapa de desarrollo de los embriones somáticos puede tener un efecto doble, por un lado actúa como auxina propiamente dicha y por otro como un agente estresante del cultivo (Fehér y col., 2001, 2002). Se trata de un herbicida auxínico con diversos efectos asociados a esta actividad fitotóxica, pero únicamente en casos de sobredosis. Diversos autores han sugerido el efecto del 2,4D en la distribución de cargas en las membranas celulares (Goldsworthy y Mina, 1991) y en su permeabilidad (Schauf y col., 1987). Grossman (2000) describió la interacción del 2,4D con la síntesis de etileno y ácido abscísico, de forma que se incrementan los niveles celulares de las llamadas hormonas de estrés. El ANA no tiene este efecto estresante en el cultivo, ni funciona como auxina herbicida, por lo que su efecto es diferente. Por otro lado Utsuno y col. (1998) estudiaron mutantes *agr1* de *arabidopsis*, afectados en el transporte de auxinas, y observaron que el tipo de transportador era diferente para auxinas como el

ANA y ácido indol-acético (AIA) y para el 2,4D. Las diferencias en el transporte pueden originar importantes diferencias de actividad.

La tercera etapa corresponde al desarrollo de los embriones en el cultivo. Inicialmente los embriones se encuentran en fase globular. En la inducción del siguiente estado, embriones dipolares, resultó efectivo el incremento en los niveles de citoquininas en el medio de cultivo. Como se comentó anteriormente, la disminución en la relación auxina/citoquinina facilita el desarrollo de los embriones (Fei y col., 2002). En la maduración de los embriones dipolares se empleó ácido jasmónico (AJ). Este compuesto tuvo un efecto muy positivo en el desarrollo del polo radicular de los embriones y en la formación del corno de azafrán. Un efecto similar al observado en nuestro estudio ha sido descrito por otros autores en ajo y narciso (Ravnikar y col., 1993 y Santos y col., 2000 respectivamente). Tras aplicar AJ al medio de cultivo se incrementó la concentración de sacarosa, logrando así la correcta maduración de los embriones hasta plántulas. El aumento en la concentración de azúcares en el medio actúa a dos niveles: en primer lugar la presión osmótica es mayor, favoreciendo la maduración de los embriones somáticos (George, 1993) y en segundo, gracias a la acción del AJ se acumulan proteínas de reserva en órganos de reserva como el corno de azafrán. Robert y col. (1997) describieron la importancia del AJ en el almacenamiento de proteínas de reserva.

Los sistemas tradicionales en el cultivo *in vitro* han sido medios sólidos y líquidos. En las últimas décadas se han puesto a punto sistemas alternativos con las ventajas de ambos tipos de cultivo. Uno de estos métodos es el cultivo en sistemas de inmersión temporal (SIT). En el presente trabajo la inmersión temporal proporcionó rendimientos en peso fresco que triplicaban los de cultivos sólidos. Además se redujo drásticamente el tiempo empleado, la cantidad de medio de cultivo y el espacio necesario para el mantenimiento del material. Los SIT han sido empleados con éxito en la micropropagación de banana (Alvard y col., 1993) y caña de azúcar (Lorenzo y col., 1998) entre otros. Lorenzo y col. (2001) observaron un incremento en la brotación en explantes de caña de azúcar cultivados en inmersión temporal. El tiempo de inmersión tiene efectos fisiológicos sobre el explante y regula los procesos de estrés (Martre y col., 2001) por lo que es uno de los parámetros mas importantes en este tipo de sistemas.

4.1.0. La respuesta en inducción de callos embriogénicos estuvo condicionada por la época del año en la que se tomaron los explantes

La respuesta diferencial de los explantes usados en la inducción de callogenesis es debida al distinto nivel de desarrollo de los cormos madre en cada época del año. El estado fisiológico del explante donador del tejido condiciona la competencia de las células que lo componen y por tanto la capacidad del explante para producir la respuesta esperada.

De esta forma en el mes de mayo el cormo se encuentra en el momento anterior a la dormancia estival, se trata ya de un cormo independiente, con una región meristemática central independiente del cormo progenitor. Es a partir de esta época cuando se observa respuesta en la inducción de callo en las regiones meristemáticas, hasta el mes de octubre. De noviembre y diciembre no hay datos.

George y col. (1992) realizaron estos experimentos con un conjunto de cormos de azafrán, procedentes de cultivo controlado, en diferentes momentos de desarrollo para asegurar la respuesta del explante. Ashok y col. (1994) emplearon cormos hijos tras el periodo de floración en el mes de noviembre, observándose respuesta positiva en las yemas laterales. Este resultado coincide con lo obtenido en nuestro estudio aunque el porcentaje de respuesta del material fue mucho mayor en el trabajo de Ashok y col. que en el nuestro.

Dhar y Sapru, (1993) seleccionaron cormos en brotación en el mes de septiembre tras la dormancia; solo formaron callos los ápices florales. En el presente estudio se obtuvieron callos por cultivo de meristemas pero no se mantuvieron hasta el siguiente subcultivo.

Finalmente, otros autores han obtenido callos usando como explantes meristemas centrales de cormos en estado de dormancia en el mes de agosto (Piqueras y col., 1995). En nuestro caso ha sido el material que proporciona una mejor respuesta (también julio, aunque algo menor) tanto en la inducción como en los sucesivos subcultivos.

4.1.1. La multiplicación en medio sólido de los callos embriogénicos se mejoró considerablemente en un medio con ANA y BAP

La fase de multiplicación de los callos embriogénicos es muy importante puesto que este punto condiciona gran parte del rendimiento final. Cuanto mayor sea la multiplicación y la estabilidad de la capacidad embriogénica durante la misma, mayor será el número de plántulas obtenidas al final del proceso.

En nuestro estudio la combinación de ANA con BAP en los medios D y E (Figura 18A, capítulo 3) proporcionó los mejores resultados. El paso de los callos embriogénicos de un medio de inducción a un medio con una relación auxina/citoquinina cuatro veces inferior favoreció el desarrollo de los embriones y la rápida multiplicación.

Filonova y col. (2000) demostraron que el desarrollo de las masas proembriogénicas (PEMs), que conforman los callos embriogénicos en sus primeras fases podía ser inhibido por auxinas. Esta actividad inhibitoria explica el mayor desarrollo de los callos embriogénicos de azafrán en medios con la mitad de auxinas y el doble de citoquininas. Las auxinas son necesarias en la iniciación de los cultivos embriogénicos, la formación de las PEMs. LoSchiavo y col. (1989) propusieron como posible modo de acción de estos compuestos la regulación de la expresión génica mediante metilación. Kutschera (1994) estudió el efecto de estos reguladores sobre la acidificación del citoplasma y pared celular vegetal, como posibles vías de inducción del proceso de embriogénesis somática en plantas. La supresión total o parcial de las auxinas del medio de cultivo puede afectar a la expresión de genes necesarios para el desarrollo de las PEMs (Zimmerman, 1993) y por tanto inhibirlo.

Pese al papel inhibitorio de las auxinas al ser eliminadas totalmente del medio de cultivo en el presente estudio se observó que los callos no crecían y acababan muriendo (medios A y B, Figura 18A, capítulo 3).

Las necesidades de los cultivos con respecto a las auxinas son muy diferentes. En la embriogénesis somática de cereales es necesario retirar totalmente las auxinas del medio para permitir el desarrollo de los embriones tras la inducción (Bhaskaran y Smith, 1990). Esto mismo se ha descrito en embriogénesis somática de *Narcissus confusus* L. (Selles y col., 1999). En otras especies, el desarrollo de los embriones se produce en el mismo medio de inducción de embriogénesis; es el caso de *Gladiolus* sp (Stefaniak, 1994). En el cultivo de embriones somáticos de *Allium sativum* L. la inducción se realiza en un medio con 0,5mg de 2,4D y el desarrollo en un medio con 0,1mg/l de 2,4D (Fereol y col., 2002). Esta disminución en la concentración de auxinas desarrollada para el ajo es similar al sistema descrito en el presente estudio para el azafrán. George y col. (1992) obtuvieron embriones somáticos de azafrán empleando 2,4D, mientras que Ahuja y col. (1993) llegaron a resultados similares con ANA.

Sofiari y col. (1997) estudiaron las diferencias entre 2,4 D y ANA en la inducción de embriogénesis somática de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz), observando que el 2,4 D

era más eficaz en la inducción de embriogénesis primaria y el ANA en la embriogénesis secundaria.

En el medio óptimo para la multiplicación de callos embriogénicos de azafrán se empleó 1mg/l de BAP. Las dosis de citoquininas que se requieren en embriogénesis somática son, al igual que ocurre en el caso de las auxinas, muy variadas en función de las características de la especie. Se incorporan en bajas concentraciones al medio de cultivo en la inducción de callos embriogénicos, sin embargo en monocotiledóneas como *Dactylis glomerata*, concentraciones inferiores a 0,001µm inhiben la formación de embriones (Fujimura y Kosamine, 1975). Incluso en algunos genotipos la presencia de elevadas concentraciones endógenas de citoquininas impiden la embriogénesis (George, 1993). Las citoquininas estimulan la división celular y regulan la morfogénesis. En el presente estudio se observa un efecto positivo en el crecimiento de los callos embriogénicos cuando duplicamos la concentración de citoquinina en el medio. Al eliminar las totalmente las citoquininas del medio los callos embriogénicos de azafrán no se desarrollan y mueren (medio G, Figura 18A, capítulo 3) por lo que se evidencia que las citoquininas son necesarias para el correcto desarrollo de los cultivos. En el presente trabajo el grado de multiplicación de los callos embriogénicos fué mayor en todos los casos en condiciones de oscuridad. El efecto negativo de la luz en el crecimiento *in vitro* del material vegetal ha sido descrito en numerosas especies pertenecientes a todos los grupos de plantas (George, 1993). La luz puede actuar como un elemento de estrés, por lo que puede resultar perjudicial sobre todo en callos, tejidos poco estructurados y conformados por células con paredes débiles. Tyburski y col. (2004) estudiaron el efecto positivo de la luz en el desarrollo de raíces de hipocótilos de tomate. Este efecto parece estar relacionado con la interacción de la luz con los fitorreguladores, fundamentalmente con los niveles endógenos y exógenos de auxinas y el transporte de estas (inhibidores del transporte de auxinas como el TIBA bloquearon la formación de raíces). Kendrick y col (1994) estudiaron mutantes fotomorfogénicos de tomate y establecieron que el efecto morfogénico de la luz estaba relacionado con el desarrollo de fotorreceptores, fitocromos y citocromos, y que debía existir una cooperación entre ambos tipos de fotorreceptores.

4.1.2. El empleo de TDZ no resultó efectivo en el desarrollo de los embriones de azafrán

Una vez establecido el medio óptimo para la multiplicación de los callos embriogénicos de azafrán el objetivo fue lograr el desarrollo de los embriones hasta plántulas. Un primer paso en esta maduración es la formación del polo apical, necesario para la obtención de embriones dipolares. Para lograrlo se empleó una combinación de dos citoquininas diferentes (BAP y TDZ) con ácido jasmónico (AJ). Los resultados de este ensayo no resultaron significativos (Figura 22, capítulo 3), ninguna de las combinaciones ensayadas proporcionó un desarrollo de los embriones notable. En contraposición con estos resultados, Victor y col. (1999) obtuvieron una respuesta muy positiva de los explantes en medios con TDZ frente a la de explantes tratados con BAP en la inducción de embriogénesis somática en semillas de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.). Singh y col. (2001) estudiaron el efecto del TDZ (en general fenilureas) sobre segmentos nodales de rosa, constatando su efecto en brotación, si bien no se indujo embriogénesis somática.

En esta fase del presente estudio se seleccionó el BAP como citoquinina optima para el desarrollo de los embriones, ya que la respuesta con TDZ fue muy desigual. El TDZ tiene efectos fisiológicos similares a otras citoquininas (Mok y col. 1982, Visser y col, 1995), pero elevadas concentraciones o tratamientos prolongados pueden originar un desarrollo irregular de los tejidos, necrosis o excesiva formación de callo, como se ha observado en algunos callos tratados en este estudio y se ha constatado en otras especies (Huetteman y col., 1993, Bhagwat y col., 1996, Kim y col., 1997). Estos efectos podrían estar relacionados con el papel del TDZ como regulador del metabolismo de auxinas y citoquininas (Victor y col., 1999).

Pese a que el TDZ, en general las fenilureas, se consideran reguladores con actividad citoquinina (regulan la división celular, crecimiento y diferenciación de tejidos y órganos y biosíntesis de clorofilas (Visser y col., 1995)), e implicados en la biosíntesis y acumulación de citoquininas púricas en los tejidos (Thomas y Katterman, 1986), se ha comprobado que tienen también cierta actividad auxina. Murthy y col (1995) comprobaron que en semillas de cacahuete tratadas con TDZ se producía un incremento de la proporción de auxinas y citoquininas con respecto a controles sin TDZ. Estos compuestos tendrían por tanto un doble papel: una actividad citoquinina promoviendo la

división celular y diferenciación de los tejidos y una menor actividad auxina, crucial en la inducción de embriogénesis somática.

4.1.3. La relación Auxina/Citoquinina resultó fundamental en el desarrollo de los embriones somáticos de azafrán

Se realizó un ensayo para profundizar en el efecto del BAP en el desarrollo de los embriones en combinación con ANA y AJ (Figura 24, capítulo 3). El máximo desarrollo de embriones dipolares en este ensayo se obtuvo con niveles elevados de BAP e intermedios de ANA.

Observando la evolución de estos embriones durante ocho semanas de cultivo se apreció que el desarrollo de los embriones continuaba y se iban diferenciando los polos del embrión hasta formarse un embrión dipolar. La competencia dentro de un mismo explante con numerosos embriones en diferentes momentos de desarrollo, provocó que algunos embriones crecieran en detrimento de otros que morían al cabo de ocho semanas. El equilibrio auxina/citoquinina establecido con niveles elevados de BAP e intermedios de ANA se mantuvo en el medio ANA2, medio que fue seleccionado en esta fase por tener menor contenido hormonal y similares efectos en el desarrollo de los embriones hasta el estadio dipolar. Los niveles de auxinas debían mantenerse puesto que están implicadas en procesos de división celular y diferenciación. Un incremento en los niveles de citoquininas es necesario para que se induzca la polaridad del embrión. Charrière y Hahne (1998) propusieron como posible explicación a esta necesidad de la presencia de citoquininas en el establecimiento de la polaridad, que tales reguladores (concretamente el BAP) se requieran para la inducción de división celular en la zona de respuesta. El BAP promueve el desarrollo del polo apical y radicular en el embrión.

El AJ no pareció ejercer ningún efecto a este nivel siendo el desarrollo similar al control en todos los tratamientos. Profundizando en el grado de modificación basal (desarrollo del polo radicular) inducida con las concentraciones inferiores de AJ, se constató la ausencia de diferencias con respecto al control. Por lo general el AJ se relaciona con fases posteriores del desarrollo de los embriones o de organogénesis (Creelman y col., 1997b). El AJ está relacionado con la acumulación de proteínas en los órganos de reserva y con el metabolismo de carbohidratos, por lo que parece razonable que su efecto en este sentido se ponga de manifiesto en estadios de desarrollo de los embriones

más avanzados. Santos y Salema (2000), emplearon con éxito AJ en la inducción y desarrollo de brotes en *Narcissus* como parte de un programa de organogénesis. El efecto del AJ en explantes más tempranos se puede atribuir a la gran diversidad de funciones que desempeñan los jasmonatos.

4.1.4. El tiosulfato de plata y la putrescina tuvieron un efecto muy positivo tanto en el crecimiento como en la maduración de los embriones

En los ensayos realizados con TIBA y NPA no se observó diferenciación de los embriones; sin embargo el crecimiento en presencia de 50µm de NPA fue muy significativo (Figura 26A, capítulo 3).

TIBA y NPA son antiauxinas (exactamente inhibidores del transporte de auxinas). El NPA actúa rompiendo la respuesta trópica, reduciendo la dominancia apical, inhibiendo la formación de ápices florales y raíces laterales (Estelle, 1998). Ambos reguladores se emplearon en este ensayo como posibles inductores de diferenciación de los embriones, dado que inhiben la síntesis o el transporte de auxinas en el tejido y podrían secuestrar los excesos de auxinas endógenas, favoreciendo así el desarrollo de los embriones somáticos de azafrán. Diversos autores han descrito el papel del TIBA como promotor de la embriogénesis somática en *Hordeum* (Claphan, 1973) y *Zea mays* (Genovesi y Collins, 1982). Voyiatzi y Voyiatzis (1988) emplearon el TIBA en la inducción de brotes axilares en *Rosa híbrida*, Toldi y col. (1996) lograron un incremento significativo de la brotación de *Beta vulgaris* L. Tyburski y col. (2004) mostraron un efecto del TIBA inhibidor del crecimiento de raíces de tomate. Fujimura y Komamine (1979) describieron sin embargo el papel inhibitorio de la embriogénesis somática del ácido 2, 4, 6 triclorofenoxiacético (2, 4, 6, T) (otra antiauxina) en suspensiones de zanahoria. Schiavone y col. (1987) describieron el efecto de TIBA y NPA en el bloqueo del proceso embriogénico de embriones de zanahoria. En embriones de *Brassica juncea* L. Hadfi y col. (1998) observaron la formación de embriones gemelos por adición de NPA durante el estadio globular. Este compuesto provocaba la duplicación del polo radicular si se aplicaba sobre embriones en fase de transición al estadio corazón. Numerosos autores han descrito el desarrollo anormal de embriones somáticos en presencia de inhibidores del transporte polar de auxinas (Choi y col. (2001) en Ginseng siberiano; Find y col. (2002) en *Abies nordmannia*). Esta alteración del desarrollo podría explicar el crecimiento diferencial de los callos embriogénicos de azafrán tratados con NPA en

nuestro estudio. El efecto del NPA sobre los callos de azafrán puede ser debido además a interacciones de este compuesto con niveles tanto endógenos como exógenos de fitohormonas. Choi y col. (2001) estudiaron el efecto del TIBA sobre la formación y desarrollo de embriones somáticos de *Eleuterococcus senticosus*, observando inhibición en la formación y desarrollo de embriones somáticos pero sin efecto sobre la proliferación celular. Estos resultados son acordes con los que hemos obtenido en callos embriogénicos de azafrán.

El ácido salicílico y el cloruro de cobalto son dos inhibidores de la síntesis de etileno. En el presente estudio tales compuestos estimularon la diferenciación de los embriones somáticos de azafrán (Figura 29A y B, capítulo 3). La respuesta óptima correspondió a 0,5µm de ácido salicílico. Duncan y col. (1987) describieron el efecto positivo de los inhibidores de etileno sobre la diferenciación de embriones somáticos de maíz. Otros autores han señalado el papel de estos compuestos en fenómenos de organogénesis de *Helianthus annuus* (Robinson y col., 1987) y de *Brassica* sp (Chi y col., 1990). Quiroz y col. (2001) estudiaron el efecto de concentraciones picomolares de ácido salicílico sobre la embriogénesis somática en suspensiones celulares de café. Este compuesto produjo un significativo incremento tanto en el crecimiento celular como en el número de embriones somáticos obtenidos. El incremento en el número de embriones somáticos producido por el cultivo de los explantes con ácido salicílico obtenido por Quiroz y col. puede explicarse por un incremento en la proporción de células embriogénicas. Esto mismo había sido sugerido como efecto de la inhibición de la síntesis de etileno por Roustan y col. (1989). El mecanismo de acción del ácido salicílico está mediado por la producción de etileno. En concentraciones picomolares bloquea la conversión del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en etileno (Roustan y col., 1989). Pero esta actividad depende tanto de la concentración de ácido salicílico como de la especie en estudio. Meijer y col. (1988) estudiaron el efecto de concentraciones picomolares de ácido salicílico en el desarrollo de embriones de *Medicago sativa* observando la ausencia de inhibición de la síntesis de etileno y una inhibición en la embriogénesis somática. Se han descrito otras posibles vías de acción de este compuesto sobre los tejidos. Así Jain y col. (1981) observaron el efecto de elevadas concentraciones de ácido salicílico sobre cambios en la organización de las membranas celulares en semillas de

maíz y De Meyer y col. (1999) observaron la activación del SAR (sistema de resistencia adquirida) en judía por adición de pequeñas dosis de ácido salicílico.

En nuestro trabajo los compuestos implicados en la actividad del etileno como la putrescina (antagonista del etileno) y el tiosulfato de plata (inhibidor de los receptores del etileno) resultaron ser los compuestos más efectivos en el crecimiento y maduración de los embriones somáticos de azafrán (Figura 29, C y D, capítulo 3). La putrescina resultó muy eficaz tanto en concentraciones bajas (provocando el inicio de desarrollo de embriones) como en concentraciones elevadas (originando embriones dipolares desarrollados). Diversos autores han descrito el papel de las PAs exógenas en la embriogénesis somática. Kevers y col. (2000) emplearon con éxito Spd en la inducción de embriogénesis en *Panax ginseng*. Más común ha sido el estudio del efecto de la Put en embriogénesis (Minocha y Minocha, 1995; Yadav y Rajam, 1997).

Los callos embriogénicos en cultivo con 0,6 μm de tiosulfato de plata triplicaron su crecimiento respecto al control. Tanto 0,6 μm como 3 μm de tiosulfato de plata provocaron diferenciación de los embriones en cultivo. Otros autores han descrito la toxicidad de este compuesto en dosis superiores a 1 μm en hojas de *Nicotiana tabacum* L. (Aharoni y Lieberman, 1979) y en tomates (Atta-Aly y col., 1987). Esta toxicidad es debida a la liberación de iones plata en exceso y puede tener un efecto mayor o menor en función del tipo de planta y del tejido.

Otros compuestos empleados en nuestro estudio como el AVG (aminoetoxivinilglicina) y BITC (bencilisotiocianato) (inhibidores de la síntesis de etileno), floriglucinol (derivado fenólico) y el peróxido de hidrógeno (agente inductor de estrés oxidativo) no provocaron ninguna respuesta significativa en el crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos de azafrán (Figura 26B, capítulo 3). Hanower y Hanower. (1984) describieron el efecto positivo del floriglucinol en la embriogénesis somática de la palma de aceite. Por otro lado Find y col. (2002) observaron incrementos en la proliferación celular y ausencia de diferenciación en el tratamiento de embriones de *Abies nordmanniana* con este compuesto. La falta de respuesta en nuestro trabajo podría explicarse por la distancia evolutiva entre las especies. Por otro lado Kairong y col. (1999) indujeron la formación y desarrollo de embriones somáticos de *Lycium barbarum* L. por adición de 200 μm de H_2O_2 , en contraposición al resultado obtenido en callos embriogénicos de azafrán.

4.1.5. El ácido jasmónico (AJ) es un compuesto muy efectivo en las últimas etapas de maduración de los embriones somáticos de azafrán.

En nuestro estudio se empleó el ácido jasmónico como inductor de la maduración de los embriones. La diferenciación de los polos apical y radicular del embrión se mejora considerablemente mediante cambios en la composición del medio de cultivo. Koda (1997) describió ampliamente la capacidad de los jasmonatos (ácido jasmónico y metil-jasmonato) como reguladores en diversas rutas morfogénicas. Los jasmonatos inhiben el crecimiento de brotes en monocotiledóneas y provocan la abscisión de las semillas. El efecto inhibitorio del crecimiento de brotes es similar al observado por tratamiento con ABA; sin embargo esta inhibición es restaurada con la adición de sacarosa al medio de cultivo por lo que el mecanismo de acción es diferente al del ABA. En el mecanismo de escisión de semillas no está implicado el etileno. Miyamoto y col. (1997) estudiaron el modo de acción de los jasmonatos en estos procesos. La inhibición en el crecimiento de brotes parecía ser debida a la alteración en la síntesis de polisacáridos de la pared celular. La abscisión de las semillas se produciría gracias a la alteración de la pared celular de las células de la zona de abscisión, incrementando la actividad de la celulasa y reduciendo los niveles de UDP-glucosa (en relación con la síntesis de celulosa) entre otros posibles mecanismos. Otro de los efectos importantes de los jasmonatos es la inducción de tuberización que parece estar relacionada con incrementos en la actividad lipoxigenasa (Kolomiets y col., 2001) y con la inhibición de la expresión y actividad de una proteína-quinasa dependiente de calcio (CDPK) (Ulloa y col., 2002). Este tipo de proteínas están implicadas en la transducción de señales de estrés (Sheen, 1996). Por último, los jasmonatos están relacionados con las proteínas de reserva en plantas. Los niveles de jasmonatos en órganos de reserva son muy elevados en relación con otras partes de la planta. Además los jasmonatos regulan la expresión de genes que codifican proteínas de reserva vegetativa (VSPs) (Staswick, 1994).

En un primer ensayo con AJ en el presente trabajo se apreció en todos los casos un claro efecto positivo de este compuesto en la maduración de los embriones somáticos de azafrán. Los embriones desarrollaban el polo radicular y se formaban cormillos de diferentes tamaños (Figura 29A y B, capítulo 3). Disminuyendo la concentración de citoquininas (medio MAD1) se apreció una respuesta inicial buena, pero los embriones no finalizaron su desarrollo (Figura 31A, capítulo 3).

Diversos autores han descrito un efecto similar del ácido jasmónico en otras especies de bulbosas. Koda (1991) estudió la relación del AJ con la tuberización, Ravnikar y col. (1993) lo emplearon con éxito en el desarrollo de brotes y formación de bulbos en ajo. Santos y Salema (2000) mostraron su efecto en el desarrollo de bulbos de narciso, empleando un medio con BAP y ANA o 2,4 D, en niveles del orden de diez veces superiores a los empleados en nuestro trabajo pero con una relación auxina/citoquinina similar a la empleada en embriones de azafrán. Posteriormente aplicaron solamente AJ, 1mg/l que proporcionó el resultado más satisfactorio. Estos resultados difieren de los obtenidos en nuestro estudio donde la dosis óptima de AJ fue inferior (0,5mg/l) y en combinación con BAP.

En un ensayo adicional realizado en el presente trabajo se obtuvo un engrosamiento de los embriones significativamente mayor al control con dosis de AJ y BAP diez veces superiores a las óptimas. Este resultado se debe probablemente a la elevada concentración de AJ.

4.1.6. El grado de madurez de los embriones en el momento de añadir el AJ al medio parecía ser determinante en la respuesta final

Las diferencias entre embriones más y menos desarrollados (Figura 32A-D, capítulo 3) en la respuesta al AJ estarían basadas en diferencias en las dosis de AJ endógeno. Los embriones FF tendrían mayor concentración endógena de AJ que los embriones FI. Nojiri y col. (1992) establecieron claras diferencias en la cantidad de AJ endógeno entre plantas de ajo con y sin bulbo, de forma que el AJ endógeno parece tener un claro papel en la formación del bulbo. Robert y col. (1997) destacaron además el papel del AJ en el almacenamiento de proteínas de reserva, con genes diana como Lox y Vsp. Por todo esto parece razonable pensar que pese a que en este el presente trabajo no se apreciaron diferencias importantes entre los embriones FI y FF el momento de desarrollo del embrión es fundamental en su respuesta al tratamiento con AJ.

4.1.7. Tratamientos con AJ y posterior incremento de la concentración de sacarosa del medio proporcionó el máximo desarrollo de los embriones hasta plántulas de azafrán

Se diseñó un experimento para determinar la relación entre el AJ y la fuente de carbono durante el proceso de maduración final de los embriones. Los mejores resultados se obtuvieron empleando AJ e incrementando posteriormente la concentración de sacarosa (Figuras 33 y 34, capítulo 3). El desarrollo de los embriones se dividió en dos etapas bien diferenciadas: una primera fase de tratamiento con AJ en la que se produce un crecimiento en longitud y una maduración del embrión, y una segunda fase con incremento en la concentración de sacarosa que origina un crecimiento del embrión en grosor y un incremento en peso fresco importante.

Estos resultados están en coherencia con los datos obtenidos por diversos autores en estudios referidos al papel del AJ en el desarrollo de plantas. Takahashi y col. (1995) observaron variaciones en los niveles de almidón y en el contenido de polisacáridos de la pared celular de células de patata durante la tuberización. Posteriormente Miyamoto y col. (1997) pusieron de manifiesto la posible relación del AJ con diversas rutas implicadas en la síntesis y degradación de la pared celular. En los últimos años se ha descrito una estrecha relación entre el metabolismo de azúcares y los niveles de AJ y metil-jasmonato en plantas, tanto en la formación de tubérculos (Debeljak y col., 2002) como en la formación de bulbos (Santos y col., 2002). Con todo esto parece claro aceptar que el AJ se encarga de activar el proceso de acumulación de proteínas de reserva. Posteriores incrementos en la concentración de sacarosa permiten la acumulación de carbonos conformando las diversas proteínas de reserva en los órganos de reserva como el cormo de azafrán.

4.1.8. El ácido giberélico (GA₃) no resultó efectivo en la maduración de los embriones somáticos de azafrán

Durante el desarrollo final de los embriones en nuestro estudio se realizó un ensayo con diferentes concentraciones de GA₃ observándose que el desarrollo de los embriones era mejor en medios sin GA₃, independientemente de la presencia o ausencia de luz (Figura 37, capítulo 3). El hecho de que la luz no afecte al desarrollo de los embriones en este punto puede deberse a que se trata de una planta con órgano de acumulación de

reservas subterráneo que se desarrolla bien en condiciones de oscuridad. Pese a no apreciarse diferencias significativas iniciales entre la respuesta en luz y oscuridad, si se observó un aspecto más saludable en las plántulas desarrolladas en luz (Figura 37A y B, capítulo 3). Radojević y col. (1992) emplearon GA₃ para inducir organogénesis de *Iris setosa*, con dosis similares a las descritas en nuestro estudio (entre 0,1 y 1mg/l de GA₃) lograron en este caso maduración y enraizamiento de las plántulas. Las diferencias con respecto a la respuesta en nuestro estudio se deben, además de tratarse de especies diferentes, a las claras diferencias morfológicas y ontogénicas entre embriogénesis y organogénesis.

En el presente trabajo no se ha empleado ABA (ácido abscísico) en la maduración de embriones sino AJ y reducción del potencial osmótico por incremento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Bozhkov y col. (1998) establecieron que el ABA, pese a ser un regulador muy común en la maduración de embriones somáticos, puede tener efectos negativos en el desarrollo posterior de las plántulas cuando la exposición es prolongada, dado que interviene en procesos de crecimiento y maduración celular a diversos niveles. En otras bulbosas el tratamiento aplicado a los embriones tras la inducción ha sido diferente. Stefaniak (1994) desarrolló embriones somáticos de gladiolo en un medio sin reguladores. En embriones de ajo, sin embargo, Fereol y col. (2002) necesitaron aplicar BAP para una correcta maduración. Sellés y col. (1999) maduraron los embriones de *Narcissus confusus* reduciendo la relación auxina/citoquinina (en un medio con BAP y 2,4D). En estudios previos en azafrán George y col. (1992) emplearon ácido indolacético (AIA) y kinetina (Kn) pero la respuesta de los explantes en este trabajo fue muy inferior a la obtenida en el presente estudio.

4.1.9. El ajuste de los tiempos de inmersión resultó una alternativa eficaz al empleo de retardantes del crecimiento en sistemas de inmersión temporal

En el presente trabajo los ensayos de multiplicación en sistemas de inmersión temporal presentaron algunas diferencias con respecto al medio sólido, debido fundamentalmente a los problemas de oxidación e hiperhidratación. Para evitar la hiperhidratación del tejido se empleó con éxito 1mg/l de paclobutrazol (PAC) (Figura 40, capítulo 3). Ziv (1991) estudio las alteraciones en el crecimiento de los tejidos en cultivo provocadas

por la hiperhidratación. Estas se caracterizan por diferentes grados de desordenes morfológicos y fisiológicos como vitrificación y crecimiento desordenado del sistema apical (Ziv, 1995). Los retardantes del crecimiento (PAC, y ancimidol, ANC, fundamentalmente) se denominan antigiberelinas porque sus efectos son revertidos por la adición de giberelinas al medio. Reducen el crecimiento vegetativo al bloquear la síntesis de giberelinas (Grossman, 1990). Su mecanismo de acción parece estar relacionado con el metabolismo de las citoquininas, provocando incrementos en la concentración de citoquininas (Opatma y col., 1997) e inhibición de la síntesis de etileno (Grossman y col., 1989). Diversos autores han empleado con éxito el PAC para evitar la hiperhidratación en la micropropagación en sistemas de inmersión temporal, (Lorenzo y col. (1998) en la caña de azúcar y Escalona y col. (1999) en piña entre otros. Escalona y col. (1999) describieron el efecto del PAC sobre el control de la brotación e inducción de la proliferación de yemas axilares, en sistemas de inmersión temporal favorece la agrupación de las yemas formando estructuras compactas, y limita el desarrollo de las hojas en los primeros estadios (gracias a la inhibición de giberelinas). Chen y Ziv (2001) describieron efectos contrarios en el cultivo en medio líquido de brotes y secciones de hoja de narciso. Estos autores observaron que el tratamiento con ANC inducía cambios morfogénéticos que desencadenaban en malformaciones e hiperhidratación de las hojas. Las malformaciones observadas por estos autores están relacionadas, además de con los cambios en citoquininas y giberelinas (comentados anteriormente), con la alteración de las actividades de enzimas antioxidantes y con cambios en los niveles de proteínas y de almidón. Pese a la respuesta inicial de las hojas al tratamiento Chen y Ziv (2001) establecieron que en un segundo periodo se producía la formación de centros meristemáticos en las secciones de hoja hiperhidratadas de narciso. La hiperhidratación parecía por tanto un requisito previo en la formación de estos centros meristemáticos.

Una alternativa al empleo de PAC u otro retardante del crecimiento es el ajuste de los tiempos de inmersión. En el presente estudio, 1mg/l de paclobutrazol resultó efectivo en unas condiciones determinadas de cultivo (15 min de inmersión cada 3 horas). En sucesivos ensayos se ajustaron las frecuencias de inmersión (5min cada 3 horas) y la hiperhidratación fue desapareciendo de forma que no fue necesario finalmente el empleo de PAC. Además del tiempo y frecuencia de inmersión hay otros dos parámetros importantes en los sistemas de inmersión temporal; el inoculo inicial y el

volumen de medio de cultivo empleado por recipiente. Por lo general los valores de estos parámetros oscilan mucho de unas especies a otras (Etienne y col., 2002).

Otro de los problemas importantes que encontramos en nuestro estudio fue la oxidación del tejido en cultivo. Para reducir la oxidación se añadieron al medio 500mg de polivinilpirrolidona (PVP); este compuesto además de eliminar casi por completo la oxidación parece favorecer la multiplicación (Figura 39, capítulo 3). Singh y col. (2001) estudiaron los efectos de la PVP relacionándolos con la disminución de la concentración de compuestos fenólicos provocada por su al medio de cultivo. Por otro lado, Lorenzo y col. (2001) analizaron el efecto de los compuestos fenólicos sobre el crecimiento y brotación en sistemas de inmersión temporal, observando un claro efecto positivo en la brotación y ninguno sobre el crecimiento.

4.1.10. La fase de multiplicación de los callos embriogénicos se mejoró considerablemente empleando sistemas de inmersión temporal (SIT)

Se realizó un ensayo para determinar la combinación de reguladores óptima para la multiplicación de los callos embriogénicos de azafrán en los sistemas de inmersión temporal. El incremento en peso fresco fue máximo con 2mg/l de BAP y 0,1mg/l de 2,4D (23,4g, Figura 41, capítulo 3). Estableciendo una comparación entre el rendimiento en medio sólido e inmersión temporal se aprecia que el rendimiento en peso fresco obtenido en los sistemas de inmersión temporal es muy superior. Lorenzo y col. (1998) observaron este mismo efecto en el cultivo en SIT de caña de azúcar. En este estudio el rendimiento en inmersión temporal duplicaba al obtenido en medio sólido. Alvard y col. (1993) en estudios en banana obtuvieron un rendimiento en inmersión temporal cinco veces superior al obtenido en cultivo sólido. Muy similares fueron los resultados obtenidos en nuestro estudio donde el rendimiento en peso fresco en cultivo en sistemas de inmersión temporal fue cuatro veces el obtenido en medio sólido.

4.1.11. La respuesta de los embriones a las diferentes combinaciones de reguladores en SIT fue similar a la observada en medio sólido

Se realizaron en nuestro trabajo diversos ensayos con diferentes combinaciones de reguladores para comprobar su efecto en cultivo en SIT. Comparando el efecto de las dos auxinas empleadas (ANA y 2,4D) se constató que, al igual que sucedía en medio

sólido, el ANA favorecía la proliferación (Figura 43, capítulo 3) y el 2,4 D inducía mayor grado de diferenciación. Incrementos en la concentración de citoquininas (BAP) por encima de un determinado valor no provocaron un grado de diferenciación (el comportamiento es similar al observado en medio sólido). Pese a la similitud en la respuesta se aprecia que los tratamientos en SIT favorecieron la multiplicación, como se comentó anteriormente, y la diferenciación.

Cabason y col. (1997) estudiaron el efecto del cultivo en SIT en el desarrollo de embriones de *Citrus* sp, mostrando su efecto positivo en el desarrollo de los embriones. Escalant y col. (1994) llegaron a la misma conclusión en cultivo de *Musa* spp. Por otra parte Etienne y col. (2002) describieron el efecto del cultivo en SIT en la proliferación de brotes, microtuberización y embriogénesis somática.

Los SIT proporcionan un mayor número de embriones por cultivo, mayor calidad, menor proporción de desarrollo anormal y una mayor sincronización en el desarrollo de los embriones. El cultivo en estos sistemas reduce la acción extracelular de sustancias tóxicas y de inhibidores de crecimiento, por otro lado la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes aumenta gracias al medio líquido y a la agitación. Todos estos factores favorecen el crecimiento y desarrollo de los embriones (Etienne y col., 2002).

4.1.12. La fuente de carbono empleada en el cultivo y su concentración pueden ser determinantes en el grado de desarrollo de los embriones en SIT

Estudiando el efecto de diferentes fuentes de carbono en varias concentraciones sobre desarrollo de los embriones somáticos de azafrán (Figura 44, capítulo 3) se observó que al disminuir ligeramente la concentración de sacarosa el grado de diferenciación era mayor. Generalmente, tanto en medio sólido como en sistemas de inmersión temporal el equilibrio óptimo entre los nutrientes que componen el medio de cultivo se obtiene con 30g/l de sacarosa y MS completo o 1/2 MS en función del tipo de cultivo. El tipo de fuente de carbono y la cantidad necesaria para el desarrollo está en función de la especie, del sistema de cultivo y de la respuesta esperada. Cabason y col. (1997) emplearon con éxito una mezcla de sorbitol y galactosa en cultivo en SIT de *Citrus* sp. Elio y col. (1999) emplearon 20g/l de sacarosa para la producción de microtubérculos de patata en inmersión temporal. Martre y col. (2001) sin embargo emplearon 80g/l para el cultivo de callos de *Hevea brasiliensis* L. en el mismo tipo de sistema de cultivo. En

El presente trabajo 30g/l de sacarosa fue la concentración adecuada para un crecimiento optimo, pero el desarrollo de embriones fue mejor con 20g/l de sacarosa.

En medios líquidos la disponibilidad de la fuente de carbono es mayor. Esto puede explicar el mejor desarrollo de los embriones con concentraciones inferiores de fuente de carbono. La fuente de carbono no solo sirve como nutriente en el medio sino que tiene un papel muy importante como componente osmótico. Además la hidrólisis de disacáridos funciona como una señal inductora de la síntesis de proteínas de reserva (Iraqi y col., 2001). Las invertasas y glucosa sintetasas son las enzimas encargadas de degradar la sacarosa en glucosa y fructosa. Estos azúcares simples funcionan como moduladores de la expresión génica (Koch, 1996). Se han descrito numerosos genes regulados por azúcares simples relacionados con la síntesis de polipéptidos implicados en el metabolismo, la percepción de la luz o la regulación del ciclo celular entre otros (Jang y Sheen, 1997), por lo que pueden estar implicadas directamente en la regulación de la expresión génica que realizan los azúcares en plantas, control de la diferenciación y desarrollo de plantas (Sturn y Tang, 1999). La expresión de invertasas ácidas está regulada por azúcares de forma que hay dos tipos de genes, los regulados positivamente que se expresan cuando se incrementa la fuente de carbono, y los regulados negativamente que se inhiben cuando se incrementa la fuente de carbono y se activan cuando disminuye (Sturm, 1999). El papel de las invertasas en el desarrollo de las plantas se ha deducido mediante la correlación entre esta actividad y los procesos que tienen lugar en las plantas. Ricardo y col. (1970) observaron un incremento en la actividad de invertasas ácidas durante el crecimiento de tejidos y desarrollo de raíces en zanahoria. Gibeaut y col. (1990) estudiaron los incrementos de actividad en relación con la osmoregulación en *Avena sativa*. La actividad invertasa fue estudiada también por Pfeifer y col. (1995) en relación con la elongación celular (la turgencia celular se mantendría gracias a la hidrólisis de azúcares).

4.2 MORFOLOGÍA DEL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AZAFRÁN.

El proceso de embriogénesis somática se define como el desarrollo de embriones dipolares diferenciados partiendo de una célula somática. La embriogénesis somática se ha estudiado ampliamente en plantas dicotiledóneas, entre las que se encuentran numerosas especies de interés agronómico y las etapas de desarrollo de los embriones somáticos están claramente diferenciadas. El modelo para estudiar la embriogénesis somática en plantas dicotiledóneas ha sido la zanahoria, Steward y col. (1958) fueron los primeros en caracterizar este proceso en zanahoria. Actualmente se comienza a tener un conocimiento más detallado del control genético de la embriogénesis somática (Chugh y col., 2002). En plantas monocotiledóneas la investigación ha sido más lenta, pese a que especies como el trigo, maíz, arroz etc son de amplia distribución mundial y básicas para el desarrollo de determinadas regiones del planeta. La primera monocotiledónea a partir de la cual se obtuvieron embriones somáticos fue *Zea mays* (Lu y col, 1982). Posteriormente han desarrollado protocolos para la mayor parte de las monocotiledóneas de interés (Krishnaraj y col., 1995).

Tanto los embriones somáticos de plantas monocotiledóneas como los de dicotiledóneas comienzan su desarrollo a partir de masas proembriogénicas formadas por 6-8 células. Posteriormente se va desarrollando un embrión globular que se correspondería con el segundo estadio de desarrollo de embriones en monocotiledóneas y el tercero en dicotiledóneas (donde hay un estadio proglobular intermedio). A partir de este punto los estadios de desarrollo son completamente diferentes; en monocotiledóneas aparecen el escutelo y el surco escutelar, posteriormente el coleoptilo y se van diferenciando el polo apical y el polo radicular. En el desarrollo de embriones en dicotiledóneas se forma una estructura redondeada denominada torpedo donde se comienzan a diferenciar los cotiledones. Esta estructura evoluciona originando los cotiledones y el polo radicular.

Pese a que existen numerosos trabajos sobre morfogénesis en azafrán se han centrado en su mayor parte en fenómenos de organogénesis, generalmente en producción de estigmas (parte de la planta que se emplea para la obtención de la especia y por tanto único órgano de interés económico). Existe muy poca información sobre el fenómeno de embriogénesis somática en *C. sativus* y tampoco se ha realizado, hasta el momento, una descripción histológica completa de los diferentes estadios por los que pasan los

embriones desde su formación hasta la obtención de plantas completas. Chichiricco (1989) estudió cada una de las etapas de desarrollo de embriones zigóticos de *C. thomasii* TEN. Estableció que el proceso de embriogénesis en *C. thomasii* era similar al que tiene lugar en *C. sativus* con la salvedad de que en azafrán se producían numerosos errores durante la formación y desarrollo de los gametos que impiden la viabilidad de los embriones zigóticos. Anteriormente estudios citológicos de ambas especies entre otros crocus habían puesto de manifiesto las similitudes entre los cromosomas de *C. thomasii* y *C. sativus* (Brighton, 1977). En nuestro trabajo se han definido los estadios por los que atraviesan los embriones somáticos de azafrán desde la inducción hasta la obtención de plántulas de azafrán (embriones totalmente desarrollados).

4.2.1. Los callos embriogénicos de azafrán mantuvieron una asombrosa capacidad embriogénica durante más de ocho años.

Diversos autores han descrito variaciones con respecto a la capacidad embriogénica en especies relacionadas con el azafrán. Stefaniak (1994) estudió líneas de callos embriogénicos de gladiolo, observando que algunas de las líneas mantenían la capacidad embriogénica durante dos años. Estas líneas se inducían en medios con una concentración de auxina muy superior a la empleada en nuestro estudio, 2mg/l de 2,4D o 10mg/l de ANA frente a los 0,1mg/l de 2,4 D empleados en nuestro trabajo. Radojević y col. (1992) describieron líneas de *Iris setosa* con capacidad embriogénica durante tres años de subcultivos, en este caso el medio de inducción contenía 5mg/l de 2,4D. Selles y col. (1999) mantuvieron en cultivo callos embriogénicos de *Narcissus confusus* en un medio con 10mg/l de 2,4D durante mas de dos años, sin embargo la capacidad embriogénica se perdió al cabo de 15 meses de cultivo.

Resultó por tanto sorprendente la capacidad embriogénica de los callos de azafrán (mantenida durante al menos ocho años) en relación con otras especies. Von Arnold y col. (2002) establecieron que una elevada capacidad embriogénica podía explicarse por el cultivo prolongado en medios con reguladores. Aun así la concentración de auxinas en nuestro trabajo fue del orden de 10 veces inferior a las empleadas por otros autores y la capacidad embriogénica muy superior.

4.2.2. Los embriones proglobulares están formados por masas proembriogénicas periféricas

Cuando se analizaron los embriones proglobulares descritos en nuestro trabajo mediante secciones observadas con microscopía óptica se apreció que estaban formados por masas proembriogénicas (PEMs). Estas PEMs aparecían en las regiones periféricas de los nódulos embriogénicos y formadas por un número de células entre cinco y diez (Figura 48, capítulo 3). Halperin y Wetherel (1964) fueron los primeros en definir las PEMs en cultivos de células de zanahoria. Se trata de varias células agrupadas en centros de crecimiento. Lee y col. (1997) estudiaron la formación de masas proembriogénicas en *Musa* spp. En este trabajo se describe como las masas de células pueden originarse por dos vías diferenciándose dos tipos de embriogénesis; a partir de una única célula (embriogénesis temprana) o a partir de un grupo de células (embriogénesis tardía). Otros autores han estudiado las masas proembriogénicas en especies más afines al azafrán, observando que están formadas por un número de células entre tres y cinco, generalmente en la región periférica. Las células tienen un citoplasma denso y un aspecto claramente diferenciable del resto (Radojević y col., 1992, en *Iris* spp, Stefaniak, 1994, en *Gladiolus* spp, Fereol y col., 2002, en *Allium* spp) estas observaciones coinciden con los datos de nuestro estudio (Figura 48C1). Fereol y col. (2002) estudiaron el citoplasma de las células que conformaban las masas proembriogénicas en *Allium* spp y establecieron que el aspecto del citoplasma de estas células se debía a la acumulación de proteínas de reserva.

4.2.3. El desarrollo de los embriones somáticos de azafrán coincide con las fases de desarrollo descritas en especies afines

En nuestro estudio se observó que las PEMs se desarrollaban dando lugar a embriones globulares, E1. Estos embriones globulares originaban embriones monopolares, E2, posteriormente embriones dipolares, E3 y finalmente los embriones dipolares se desarrollaban en plántulas o embriones en E4. Generalmente encontramos en un mismo callo embriogénico embriones en varios estadios (E1, E2 y E3). Esta misma situación fue descrita en estudios en *Iris setosa* Pall por Radojević y col. (1992).

Los embriones de azafrán en E1 observados en nuestro trabajo son similares a los descritos por otros autores en especies afines a *C. sativus*, tales como embriones globulares de *Iris setosa* Pall. (Radojević y col., 1992), embriones globulares de

Gladiolus hort. (Stefaniak, 1994), y embriones globulares de *Allium sativum* L. (Fereol y col., 2002) entre otros.

En cultivo de embriones de ajo el desarrollo de estructuras globulares no comienza hasta pasada la cuarta semana de cultivo, a diferencia de los embriones de azafrán, gladiolo e iris donde los embriones globulares estaban desarrollados en la tercera semana de cultivo. George y col. (1992) estudiaron secciones de embriones globulares de azafrán, siendo estas muy similares a las encontradas en nuestro estudio, aunque en este estudio previo se obtuvieron por cultivo en medio líquido y no se dató el tiempo que tardaban en desarrollarse.

El desarrollo de los embriones globulares de azafrán origina embriones monopolares. Este estadio no ha sido definido en estudios de otras especies. Algunos autores han descrito este estadio como globular tardío en estudios en embriones de gladiolo (Stefaniak, 1994) y plátano (Lee y col., 1997).

El estadio siguiente, dipolar, E3, es bastante uniforme en todas las especies y está, en general, mejor descrito tanto en plantas dicotiledóneas como en monocotiledóneas a nivel histológico. En nuestro estudio estas estructuras se observan de la cuarta semana de cultivo en adelante, al igual que ocurre en embriones de *Musa* spp y *Allium sativum* por ejemplo (Lee y col, 1997, Fereol y col, 2002). En *Gladiolus* el desarrollo es mas lento y los embriones dipolares no se observan hasta pasada la quinta semana de cultivo (Stefaniak, 1994).

La última etapa de desarrollo de los embriones descrita en el presente trabajo es el E4. Los embriones tardan en alcanzar este estadio entre seis y ocho semanas. En estudios en ajo el proceso de formación de plantas es aún mas lento y las plantas se desarrollan tras cuatro semanas de cultivo de los embriones bipolares (Fereol y col., 2002). Estos embriones en E4 deben cultivarse *ex-vitro* en un medio sin reguladores para completar su desarrollo. En general esta fase del cultivo se realiza en invernaderos donde se puede mantener un control de todos los parámetros externos.

Sage y col. (2000) estudiaron las fases de desarrollo de los embriones somáticos de *Narcissus pseudonarcissus* cvs Golden Harvest y St Keverne y no establecieron estadios de desarrollo de los embriones. Sin embargo en las figuras publicadas se aprecia que el desarrollo es similar al descrito en nuestro trabajo.

4.2.4. Empleo de reguladores en embriogénesis.

El desarrollo de los embriones de azafrán en nuestro trabajo se mejoró mediante un cambio en el tipo de auxina (2,4D por ANA). Este cambio provocó un descenso en la relación auxina/citoquinina. Sofiari y col. (1997) mostraron que la capacidad del ANA en la inducción de embriogénesis somática en *Mandioca* era muy inferior a la del 2,4D. Además en explantes tratados con ANA era muy frecuente la aparición de raíces de forma prematura. En nuestro estudio el ANA proporcionó buenos resultados en la multiplicación de los embriones tras la inducción y mantuvo la capacidad embriogénica del tejido. Por otro lado Radojević y col. (1992) en el estudio de embriones somáticos de *Iris setosa* Pall. precisaron también de un descenso en los niveles de reguladores (2,4D y Kn en este caso) para favorecer el desarrollo de los embriones. Jéhan y col. (1994) describieron el desarrollo de los embriones somáticos de *Iris pallida* Lam. en un medio de expresión, el Kundson's orchid agar.

La maduración de los embriones en nuestro estudio se optimizó mediante la adición de AJ y posteriores incrementos en la concentración de sacarosa. El AJ tiene un importante papel en el desarrollo completo de las plántulas de azafrán como se discutió en el apartado 4.1. Los incrementos en la concentración de sacarosa favorecen la reducción del potencial osmótico. Von Arnold y col., 2002, establecieron una serie de etapas clave en el desarrollo de los embriones somáticos entre las que se encuentra la reducción del potencial osmótico durante la maduración de los embriones. Iraqi y Tremblay, 2001, observaron en *Picea mariana* y *Picea abies* que la sacarosa además de como fuente de carbono, funcionaba como regulador osmótico, de forma que el desarrollo de embriones somáticos fue mayor en medio con 6% de sacarosa que en medios con la misma proporción de sacarosa pero hidrolizada en glucosa y fructosa

A lo largo del desarrollo de los embriones analizados en nuestro trabajo se ha constatado una clara evolución de la morfología externa acorde con los cambios observados por microscopía.

En el estadio proglobular los callos estaban formados por nódulos embriogénicos (PEMs) y regiones no embriogénicas. Los callos embriogénicos se fueron diferenciando hasta embriones E1, nodulares y compactos y bien estructurados (bajo el microscopio se

observó que los grupos de células fueron aumentando su tamaño hasta conformar estructuras globulares). Posteriormente se desarrollaba el meristemo apical del embrión, embrión monopolar, E2, se observaban pequeños ápices (emergencia del meristemo apical) que iban surgiendo de la masa de callo. Una vez formados los polos apical y radicular, el embrión pasaba al estadio dipolar, E3, aparecían en un número variable por explante pero en todo caso parte del callo permanecía como sustento del embrión. En el momento en el que el embrión se independizaba de la masa de callo pasaba a ser un embrión en E4. En la última fase del desarrollo se forma claramente un cormo en el polo radicular y un brote en el polo apical en cada una de las estructuras dipolares. Las plántulas desarrollaban las capas protectoras que rodean al cormo y se desarrollaban los brotes verdes (ver Figuras 49F y 50E, capítulo 3)

Las plántulas de azafrán así formadas deben atravesar una fase de aclimatación en invernadero para su posterior prueba en campo. Aunque en este trabajo no se llegó a aclimatar las plántulas obtenidas se apreció que en general no había mucha heterogeneidad entre los embriones en E4 obtenidos. El tamaño de los cormos fue variable debido seguramente a la necesidad de una fase de postmaduración del embrión en la que se produjera el engorde de los cormos.

4.3 EVOLUCIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO ANTI OXIDANTE DURANTE EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AZAFRÁN.

Algunos autores han relacionado los niveles de peroxidación lipídica con el crecimiento y desarrollo en plantas, Erica y col. (1992) observaron el incremento en la peroxidación lipídica a lo largo del desarrollo *in vitro* de tejidos de *vitis vinifera* L. Adams y col. (1999) estudiaron el efecto del malondialdehído (MDA) en embriones somáticos y establecieron una posible doble acción de los productos de peroxidación lipídica en cultivo de tejidos (citotóxica y citoactiva) en función de la interacción de estos productos con el estado fisiológico de los tejidos.

Las especies de oxígeno activas (radicales peróxido y superóxido), originadas por oxidación parcial del oxígeno molecular, son neutralizadas gracias a un conjunto de actividades antioxidantes, enzimáticas y no enzimáticas, en las plantas cuya acción tiene un papel importante en los procesos de diferenciación y desarrollo de tejidos.

Tanto el estudio de la peroxidación lipídica como del estado oxidativo y actividad de las enzimas antioxidantes durante la embriogénesis somática del azafrán pueden resultar muy interesantes para ser empleados como marcadores durante el desarrollo del proceso.

4.3.1. El nivel de peroxidación lipídica aumentó durante el desarrollo de los embriones somáticos.

El nivel de peroxidación lipídica fue aumentando en los cuatro estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán (Figura 51, capítulo 3), siendo mucho mayor en el último estadio de desarrollo. Adams y col. (1999) estudiaron el efecto de la peroxidación lipídica en embriogénesis de zanahoria, tanto por adición exógena de productos de peroxidación lipídica (como el MDA y 4, hidroxinonenal, HNE) como por medida de los niveles endógenos de ambos compuestos. En este último caso se observó que los callos embriogénicos tenían mayores cantidades de MDA y HNE que los no embriogénicos y que además estos compuestos parecían tener efecto a concentraciones muy bajas (del orden de nanomoles). Deighton y col. (1997) describieron también la

relación entre la peroxidación lipídica y la capacidad embriogénica de células de zanahoria. Estos estudios están en consonancia con los resultados obtenidos en embriones de azafrán: los niveles de peroxidación lipídica son máximos en el estadio 4 y además del orden de nanomoles. La peroxidación lipídica es un indicador de estrés oxidativo y estos resultados apuntan a la implicación del estrés oxidativo en el proceso de embriogénesis. Posiblemente los radicales libres originados por peroxidación lipídica provoquen ciertas actividades citotóxicas y citoactivas condicionadas por otros factores como el estado de desarrollo del embrión y el grado de activación del sistema antioxidante del tejido.

4.3.2. Los patrones de APX sensible e insensible a PHMB resultaron muy diferentes.

Se estudiaron dos tipos de APX, una sensible a PHMB (peroxidasa clase I) y otra insensible a PHMB (peroxidasa clase III) observándose un comportamiento muy diferente a lo largo de los estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán (Figura 52A y B). La APX se propone como una de las enzimas clave en los procesos de detoxificación por medio de la regulación de los niveles de ácido ascórbico. De Gara y col. (1997) estudiaron el incremento en la actividad APX y en la formación de ácido ascórbico durante la germinación en trigo, observando un aumento de los niveles de esta actividad enzimática en correlación con la presencia de ácido ascórbico y de niveles muy bajos de H_2O_2 . Este hecho les llevo a plantear que en realidad podría ser el peróxido de hidrógeno quien regula la actividad de la APX. Esta misma hipótesis fue apoyada en el trabajo de Stasolla y col. (2001) fundamentalmente en las primeras etapas (embriogénesis y mantenimiento y multiplicación de embriones) de embriones somáticos de Abeto blanco. Elevados niveles de APX contribuyen a mantener la plasticidad de la pared celular ya que disminuyen la disponibilidad de H_2O_2 utilizado por las peroxidasas de la pared celular para el ensamblaje de polímeros de la matriz (De Gara y col., 1996). Durante la maduración de los embriones estudiados por Stasolla y col. se produce un incremento en la cantidad de ácido ascórbico y de AOS fundamentalmente H_2O_2 y por lo tanto de APX. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en nuestro estudio, donde se observa un incremento secuencial de la APX sensible a PHMB desde E1 hasta E4.

En contraposición, se observa que los niveles de APX insensible a PHMB oscilan con un máximo en E2 y valores similares en el resto de estadios. Este máximo en el estadio monopolar estaría relacionado con una actividad específica de la APX clase III durante esta fase.

4.3.3. Los niveles de MDHAR fueron muy superiores en todos los estadios a los de DHAR

Los elevados niveles de actividad monodeshidroascórbico reductasa (MHAR) en relación con los de actividad deshidroascórbico reductasa (DHAR) parecen indicar un estado oxidativo medio de los embriones en los cuatro estadios (Figura 53A y B, capítulo 3).

El ácido ascórbico tiene dos niveles de oxidación, la formación de monodeshidroascorbato (por acción de la MDHAR) y la de deshidroascorbato (por acción de la DHAR). La concentración de MDHA en las células suele ser bajo. Skotland y Ljones (1980) estudiaron la rápida conversión del MDHA en DHA por desprotonación. Además el MDHA no interacciona directamente con moléculas como lípidos lo que la hace una molécula relativamente inocua (Horemans y col., 2000). Estos datos explican los niveles constantes de MDHAR obtenidos a lo largo de los cuatro estadios de desarrollo de los embriones en nuestro estudio.

Los niveles de DHAR resultaron muy inferiores a los de MDHAR. El DHA se hidroliza de forma espontánea e irreversible a ácido 2,3 dicetoglucónico (Washko y col. 1992). Los bajos niveles de DHA explican la poca actividad DHAR encontrada en nuestro estudio. Stasolla y col. (2001) no encontraron diferencias en los niveles de DHA entre líneas de callos no embriogénicos y líneas de callos embriogénicos (valores del orden de 200-400 nanomoles). Tampoco apreciaron diferencias tratando estas líneas con ácido abscísico (ABA) exógeno.

A lo largo del desarrollo de los embriones la actividad DHAR encontrada en nuestro trabajo no presenta variaciones, excepto en E3 donde la actividad se duplica. Este incremento en la DHAR estará relacionado con un incremento en la concentración de DHA, es decir una tendencia al estado reducido del ácido ascórbico. Arrigoni y col. (1992) analizaron la variación del ratio ácido ascórbico/DHA durante la maduración de semillas de *Vicia faba* L. observando un descenso de este ratio con la maduración, el estado reducido parecía ser necesario para la maduración de los embriones. Este mismo

resultado fue obtenido por Stasolla y col. (2001) en embriones somáticos de abeto blanco. En nuestro estudio el incremento en DHAR durante E3 podría deberse a la necesidad del estado reducido en la maduración de los embriones. En el E4 los embriones ya han madurado por lo que la actividad DHAR disminuye.

4.3.4. La actividad superóxido dismutasa fue máxima en embriones monopolares, E2, mientras que la actividad catalasa fue máxima en embriones bipolares, E3.

La actividad superóxido dismutasa (SOD) observada en nuestro estudio se duplicó en el paso de E1 a E2 (Figura 54B, capítulo 3). Este incremento se corresponde con un aumento en el nivel de estrés de los embriones y la producción de H_2O_2 . La SOD se encarga de la conversión de $2O_2^- + 2H^+$ en $H_2O_2 + O_2$. Las isoformas SOD estudiadas presentaron un patrón muy característico. A lo largo del desarrollo los niveles de Mn-SODs aumentaron y los de Cu, Zn-SODs disminuyeron (Figura 55A y B, capítulo 3). Las isoenzimas Mn-SOD (generalmente mitocondrial, Palma y col. (1991)) son las que más se incrementan en todos los estadios. El mismo hecho fue observado en el estudio de embriones somáticos y zigóticos de castaña por Bagnoli y col. (1998). Estos autores propusieron que los incrementos en Mn-SOD en condiciones de estrés, como puede ser el cultivo *in vitro*, podían estar relacionados con la presencia de sacarosa en el medio de cultivo. El metabolismo de sacarosa originaria estrés oxidativo en las mitocondrias que se resolvería con el incremento en los niveles y actividad de la Mn-SOD. En nuestro estudio la actividad de la SOD es máxima en el E2: formación de los embriones monopolares. Se trata de una situación de estrés en la que el metabolismo es muy activo puesto que se está produciendo crecimiento y maduración de células en el embrión. Esta situación explicaría las 30 unidades de SOD por mg de proteína detectadas.

Las isoenzimas Cu-SOD se han descrito generalmente en citosol y cloroplastos (Salin, 1988). En nuestro estudio aparecen en cantidades que además disminuyen a lo largo del desarrollo de los embriones. Una posible explicación a esto sería la capacidad de la Mn-SOD para proteger del estrés oxidativo tanto a mitocondrias como a cloroplastos y componentes del citosol, teoría ya propuesta por Bagnoli y col. (1998).

En el presente estudio se apreció también un incremento de la actividad catalasa (CAT) en los estadios finales del desarrollo de los embriones (Figura 52C, capítulo 3), la CAT

se encarga de degradar el peróxido de hidrógeno en $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Los incrementos en H_2O_2 producidos en los embriones por acción de la SOD durante el estadio dipolar, conjuntamente con la acción de la luz, pueden provocar un incremento en la cantidad de CAT y en su actividad. Siminis y col. (1994) estudiaron la expresión de formas específicas de CAT en protoplastos de tabaco tratados en condiciones de estrés luminoso. Por otra parte, de Marco y col. (1996) observaron la activación de enzimas antioxidantes en protoplastos cuando las concentraciones de H_2O_2 eran muy elevadas. El pico en la actividad CAT observado en el E3 se corresponde con el incremento de la actividad SOD en E2 que origina H_2O_2 en grandes cantidades. El peróxido de hidrógeno, junto con el paso de los explantes a luz durante este periodo, puede explicar las concentraciones de CAT del orden de 170 micromoles detectadas en el estadio dipolar.

Keyhani y col. (2002) estudiaron la estabilidad térmica y la actividad catalasa en cormos de azafrán en dormancia. Encontraron tres isoformas activas de este enzima con diferente comportamiento ante la temperatura y con un pH óptimo entre 6 y 11. Las tres isoenzimas aparecieron en cantidades similares. Las diferencias en actividad se deberían en este caso a la temperatura de reacción. En el presente estudio, sin embargo, no se han analizado variantes isoenzimáticas de catalasa.

4.3.5. La actividad glutatión reductasa se mantuvo constante a lo largo del desarrollo de los embriones somáticos de azafrán.

La glutatión reductasa (GR) es el enzima encargado de transformar la forma oxidada del glutatión (GSSG) en la forma reducida (GSH). Los niveles de GR fueron constantes a lo largo del desarrollo de los embriones, esto puede indicar un estrés oxidativo constante. El H_2O_2 originado de forma continua se encargaría de oxidar el GSH a GSSG de forma que la actividad de la GR respondería a la necesidad de regenerar GSH. Berglund y col. (1995) en su revisión sobre glutatión y estrés oxidativo, establecieron que el metabolismo del glutatión está relacionado con la embriogénesis somática y la diferenciación de tejidos, de forma que la embriogénesis somática estaría favorecida por niveles bajos de glutatión. Estos mismos autores explican el papel del GSH en la eliminación del H_2O_2 y por tanto la necesidad de regenerar la GSH para el correcto desarrollo de los embriones en situaciones de estrés. Doctor y Foyer (1998) estudiaron el ciclo ascorbato-glutatión estableciendo que en condiciones no estresantes más de el

90% del glutatión se encontraba en forma reducida (GSH). Estas elevadas concentraciones de GSH se mantenían gracias a la actividad de la GR. De Pinto y col. (2000) estudiaron la GR durante el cultivo de células de tabaco BY-2, relacionando los elevados niveles encontrados con una utilización activa del GSH. Por otra parte Belmonte y col. (2003) relacionaron el ratio GSH/GSSG con la proliferación celular, crecimiento y activación de la embriogénesis somática en plantas. Estos autores realizaron tratamientos de adición de GSH y GSSG sobre líneas embriogénicas de abeto blanco, resaltando que la GSH parecía inducir la proliferación celular y la embriogénesis y que eran necesarios unos niveles mínimos de GSH para asegurar el crecimiento y división celular, al menos en esa especie. Este mismo efecto de la GSH en la división celular se ha descrito en otras especies como *Arabidopsis* L. (Fricker y col., 2000).

Todos estos resultados sustentan una regulación del proceso embriogénico por el sistema antioxidante y más específicamente por los niveles de SOD, dado que presenta un patrón de expresión característico en cada etapa de desarrollo de los embriones. La SOD además es la encargada de regular los niveles de O_2 y H_2O_2 y se considera por tanto la vía de activación del sistema antioxidante.

El inicio de la diferenciación de embriones podría estar modulada por el balance redox celular (Kairong y col., 1999; Belmonte y col., 2003). Además, cierto nivel de estrés oxidativo es necesario para promover la formación de núcleos embriogénicos y para abrir rutas embriogénicas específicas (Earnshaw y Jonson, 1987; Kairong, 1999). En este contexto el peróxido de hidrógeno se plantea como un componente de la compleja cadena de transducción de señales implicada en la embriogénesis somática y otros muchos procesos de desarrollo de plantas (Van Breusegem y col., 2001). Recientemente, Tian y col. (2003) observaron la relación entre la producción de H_2O_2 y la emergencia de meristemos y formación de brotes en cultivo de fresa.

Las actividades enzimáticas antioxidantes se incrementan durante la diferenciación de los embriones somáticos de azafrán. Se observó sin embargo un descenso en la última etapa de desarrollo, E4, momento en el que el embrión está totalmente desarrollado. Tras el inicio del desarrollo de los embriones se producía un incremento la concentración de H_2O_2 . Este compuesto es estable y fácilmente difusible a través de

membrana por lo que es un perfecto candidato para funcionar como molécula señal durante la respuesta a estrés (Foyer y col., 1997). En los estadios posteriores de desarrollo de los embriones de azafrán se incrementó la actividad de la catalasa encargada de degradar el H_2O_2 que en concentraciones elevadas resulta tóxico para las plantas. Puntarulo y col. (1991) descubrieron las mitocondrias como principal fuente de superóxidos en la maduración de semillas de judía. En la neutralización de estos superóxidos intervienen además de la SOD el ciclo ascorbato-glutación. La oxidación de estos compuestos se pone de manifiesto en nuestro trabajo por la actividad GR (similar en los cuatro estadios), la actividad APX sensible a PHMB (se va incrementando a lo largo de la maduración de los embriones) y los niveles de MDHAR y DHAR. La GR se encarga de mantener los niveles de GSH, la cual además de impedir la inactivación de enzimas, manteniendo el centro catalítico de las formas reducidas, actúa sobre las especies activas de oxígeno y sobre la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica se emplea como mecanismo de medida del daño celular provocado por el estrés oxidativo. En condiciones de estrés ambiental, las plantas ralentizan o detienen su crecimiento en función del daño oxidativo producido. La detención del crecimiento se produce mediante la regulación del ciclo celular por la acción de una ciclina dependiente de kinasa (CDK). Schuppler y col. (1998) explicaron como esta CDK se fosforilaba y se inhibía en situaciones de estrés hídrico en hojas de trigo. La CDK parece detener el ciclo celular en el paso entre G1 y S. Por otro lado la presencia de AOS provoca un incremento de los niveles celulares de Ca^{2+} (Mehdy, 1994). Se produce la oxidación de la GSH y por tanto la inhibición del centro activo de las enzimas. La inactivación afecta a la Ca^{2+} ATPasa y provoca un mayor incremento de la concentración de calcio en el citosol (Price, 1990). El Ca^{2+} funciona como segundo mensajero a diversos niveles, induce el metabolismo defensivo ante diversos tipos de estrés y afecta a numerosas cascadas enzimáticas.

Por todas estas evidencias podemos postular que las especies reactivas de oxígeno no funcionan sólo como señales de estrés, sino que parecen tener un importante papel como señales de crecimiento y desarrollo en plantas.

4.4 NIVELES DE POLIAMINAS EN RELACIÓN CON LOS DIFERENTES ESTADÍOS DE DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE AZAFRÁN

En el ámbito específico del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosas las referencias existentes acerca de la participación de las poliaminas en diferentes facetas de la regeneración de plantas. Así, varios estudios han demostrado la correlación existente entre un incremento en niveles de PAs y división celular por un lado y un descenso en PAs asociado a la reducción de actividad metabólica por otro (Heimer y col., 1979; Berlin y Forche, 1981; Walker y col., 1985).

En relación a la embriogénesis somática fueron Montague y col. (1979) los primeros en demostrar que había un aumento significativo en actividad arginina descarboxilasa cuando cultivos de callos de zanahoria se transferían a un medio inductor de la embriogénesis. Posteriormente se ha confirmado que la formación de embriones adventicios en cultivos de zanahoria y en otras plantas es dependiente de un alto nivel de PAs (Feirer y col., 1984, Santanen y Simola, 1992, Yadav y Rajam, 1998; Kevers y col., 2000). Otras aproximaciones experimentales han confirmado esta relación. Así, estudios con inhibidores específicos de la síntesis de PAs mostraron un efecto de inhibición proporcional de la embriogénesis (Hadrami y D'Auzac, 1992; Kevers y col., 2000). Por otro lado, la adición de PAs exógenas a los cultivos embriogénicos mejora la tasa de embriogénesis (Rajesh y col., 2003). La importancia de las poliaminas en el proceso de embriogénesis somática queda igualmente argumentada en el trabajo de Shoeb y col. (2001), quienes propusieron que las poliaminas, particularmente Put y Spm, podían utilizarse como biomarcadores del proceso de regeneración vía cultivo *in vitro* en arroz.

En una primera aproximación del presente estudio se analizaron los contenidos en poliaminas totales en cada uno de los estadíos de los embriones somáticos de azafrán, observando que las poliaminas conjugadas eran mucho más abundantes que las libres en todos los estadíos excepto en el E1 (Figura 56, capítulo 3). El papel de las poliaminas conjugadas en embriogénesis ha sido menos estudiado que el de las poliaminas libres.

Diversos autores han descrito elevados niveles de poliaminas libres en relación con procesos embriogénicos (Galston y Flores, 1991; Mengoli y Bagni, 1992). En este primer estadio de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán encontramos diferencias en función de la auxina empleada en el cultivo de los callos embriogénicos. En los callos embriogénicos cultivados en 2,4D la cantidad de poliaminas tanto libres como conjugadas fue muy superior a la encontrada en callos cultivados en medios con ANA (Figura 55, capítulo 3). Las diferencias se debieron fundamentalmente a variaciones en la concentración de Put, la cual parece ser la PA más importante durante todo nuestro estudio siendo la mas abundante en la mayor parte de los estadios, tanto en el grupo de PAs libres como conjugadas. Los niveles de Put y el cociente Put/Spd suponen un factor importante en la determinación de la capacidad embriogénica del tejido (Pedroso y col., 1997) y también del potencial de regeneración en especies como el arroz (Shoeb y col., 2001).

Como se comento en el apartado 4.1, el desarrollo de los embriones somáticos de azafrán hasta el E4 se mejoró considerablemente con el empleo de ácido jasmónico (AJ). En un último estudio del patrón de PAs, se comparáron las concentraciones de poliaminas libres y conjugadas en embriones obtenidos en medios sin AJ, en medios con 0,5 y 1mg/l de AJ, y en cormos de azafrán tomados del medio natural (Figura 60, capítulo 3) se aprecia que los niveles endógenos de poliaminas pueden variar en tratamientos con jasmonato, esta afirmación ha sido apoyada por otros autores (Lee y col., 1997; Mader, 1999).

4.4.1 El diferente comportamiento embriogénico de los callos se corresponde con un patrón específico de poliaminas endógenas

Ya hemos comentado en el apartado 4.1.1 que mientras que el 2,4D parece ser necesario para el establecimiento y crecimiento de cultivo de los callos en el caso del azafrán, en presencia de esta auxina el crecimiento posterior de los mismos es lento y los callos muestran un escaso potencial embriogénico. La iniciación de los embriones somáticos es estrictamente dependiente de la presencia en el medio de ácido naftalenacético (ANA) en lugar de 2,4D, así como de un aumento en la concentración de la citoquinina empleada (BAP). Los callos mantenidos en ambos medios muestran diferencias no sólo morfológicas (Figura 21, A y B, capítulo 3) sino un perfil de PAs igualmente diferente, tanto en el tipo como en la concentración de poliaminas (Figura 56, capítulo 3), que

podrían explicar el diferente comportamiento observado por los callos en ambas condiciones. En presencia de 2,4-D (condiciones favorables para la iniciación de callos pero no para la embriogénesis) se detecta un incremento del orden de un 50% en la fracción de PAs libres y de cerca de ocho veces en la de conjugadas con respecto a callos transferidos a medio con ANA (condiciones favorables para la embriogénesis). Estos resultados están en la línea de los aportados por Aribaud y col. (1999) quienes encontraron que la formación de callos a partir de discos foliares de *Chrysanthemum morifolium* Ramat se caracterizó por una alta acumulación de PAs, libres y particularmente conjugadas, junto con una muy baja actividad de los enzimas diamino-oxidasa y poliamino-oxidasa, lo que puede explicar la pronunciada acumulación de Put encontrada en nuestro caso en los callos mantenidos en presencia de 2,4-D. Por el contrario, cuando se transfieren los callos a un medio con ANA (medio embriogénico) se redujo la acumulación total de PAs y se detectó un reparto prácticamente equivalente entre todas las poliaminas analizadas: Dap, Cad, Put, Spd y Spm en la fracción libre y todas excepto Spm en la fracción conjugada (Figura 56, capítulo 3). Esta situación nos lleva a proponer que el inicio del programa embriogénico a partir de callos en el caso del azafrán depende de un aumento en el flujo metabólico global de las PAs, incluyendo la biosíntesis, conjugación y degradación, ya que no sólo aparecen Put, Spd y Spm sino también Dap, que es un producto formado a partir de la oxidación de las PAs de mayor peso molecular, Spd y Spm, por el enzima poliamino-oxidasa. Esta hipótesis concuerda con Aribaud y col. (1999) quienes empleando un inhibidor específico de la síntesis de putrescina, redujeron la acumulación de Put e incrementaron la actividad de aminooxidasas, el cambio en el metabolismo de la PAs provocó a su vez una modificación del programa de iniciación de callos a un programa organogénico consistente en la inducción de la formación de yemas en discos foliares de *Chrysanthemum morifolium* Ramat.

La situación descrita en esta fase inicial de inducción de la embriogénesis en el azafrán y en otros materiales a partir de cultivo de callos contrasta con otros resultados obtenidos induciendo la embriogénesis a partir de tejidos organizados. Así, Yadav y Rajam (1997, 1998) trabajando con secciones de hoja de *Solanum melongena* L., encontraron una mayor concentración de PAs totales en aquellas secciones que mostraban una mayor competencia para la embriogénesis somática, e incluso

consiguieron incrementar la tasa de embriogénesis somática con la adición de Put exógena. Resultados similares han sido obtenidos en *Dactylis glomerata* L., en donde secciones de hoja con alto nivel de competencia para la embriogénesis somática contenían cuatro veces más PAs que secciones con menor capacidad embriogénica (Li y Burritt, 2003). No es descartable, por tanto, la influencia del estado de desarrollo del explante original en el perfil de PAs y que una concentración elevada de Put sea un paso previo necesario para capacitar a las células para desarrollar un programa embriogénico. Estas cuestiones, sin embargo, necesitan ser probadas experimentalmente.

4.4.2. Los niveles de PA conjugadas fueron superiores a los de libres durante el proceso de formación de los embriones somáticos

El análisis de los niveles de PAs totales realizado a lo largo de la formación y maduración de los embriones de azafrán mostró que la fracción de PAs conjugadas fue siempre superior a la fracción de PAs libres (Figura 57, capítulo 3), salvo en la fase inicial de inducción de embriogénesis ya comentada en el apartado anterior. Resultó particularmente relevante el drástico incremento registrado en el estadio 2 en la fracción conjugada de PAs, que supuso, como se indicó en el capítulo anterior, aumentar en torno a 10 veces la concentración de esta fracción de PAs con respecto al estadio 1.

Estos elevados niveles de PA conjugadas ponen de manifiesto nuevamente la importancia del metabolismo de PAs, y en concreto de algunos conjugados específicos, en la embriogénesis somática. En este sentido, Pedroso y col. (1997) encontraron una relación entre incrementos en Put y Spd conjugadas y la formación de embriones globulares en *Camellia japonica*. Yadav y Rajam. (1997) por su parte, registraron también incrementos en la conjugación de PAs durante las primeras etapas de formación de embriones en discos de hoja de *Solanum melongea* L.

4.4.3. Putrescina es la poliamina más abundante a lo largo del desarrollo de los embriones somáticos de azafrán

En numerosos trabajos se apunta a Put como la PA más abundante y que mayores cambios experimenta durante el proceso de embriogénesis somática, principalmente durante las primeras etapas de la misma (Faure y col., 1991; Santanen y Simola, 1992; Danin y col., 1993; Yadav y Rajam, 1997, 1998; Li y Burritt, 2003; Rajesh y col., 2003; Silveira y col., 2004). Esta fue también la situación encontrada en el presente trabajo en

el caso del azafrán (Figuras 58 y 59, capítulo 3). Tanto Put libre (Figura 58, capítulo 3) como conjugada (Figura 59, capítulo 3) representaron más del doble del resto de PAs analizadas en los estadíos 2 y 3 (fases de máximo desarrollo de los embriones).

El efecto de Put en la inducción y desarrollo de los embriones somáticos ha sido corroborado no sólo mediante la determinación de los niveles endógenos de PAs durante la embriogénesis, sino empleando otras aproximaciones experimentales como es la aplicación de Put exógena y el empleo de inhibidores biosintéticos específicos (Yadav y Rajam, 1997, 1998). Algunos de estos estudios también han puesto de manifiesto una importante diferencia entre el contenido de PAs de embriones somáticos y embriones zigóticos, como es en el caso de *Vitis vinifera* cuyos embriones somáticos contienen diez veces más PAs que los embriones zigóticos (Faure y col., 1991).

En otros casos, como *Panax ginseng*, fue Spd en lugar de Put la poliamina capaz de aumentar la tasa de embriogénesis somática (Kevers y col. 2000).

4.4.4. El establecimiento de la polaridad de los embriones (E2) se corresponde con un incremento en la conjugación de Put y Dap.

Comparando las Figuras 58 y 59 del capítulo 3 se puede apreciar que en la transición del estadio 1 al 2, periodo en el que se establece y fija la polaridad en los embriones del azafrán, se produce un incremento de los niveles de Put y Dap conjugadas que se corresponde, en el caso de Dap, con la desaparición de la forma libre de este compuesto. Esto, junto con el acusado aumento en la conjugación de Put destacado anteriormente, nos está indicando que el metabolismo de PAs se encuentra especialmente activo durante esta fase del desarrollo de los embriones, lo que concuerda con los resultados obtenidos por otros autores (Santanen y Simola, 1994).

4.4.5. Tratamientos con AJ en E4 provocaron un incremento en los niveles de putrescina tanto libre como conjugada

Tanto metil-jasmonato como su forma libre ácido jasmónico, conocidos colectivamente como jasmonatos, son reguladores celulares importantes implicados en diversos procesos de desarrollo en plantas, desde la germinación de semillas, crecimiento de la raíz, fertilidad, maduración de frutos hasta la senescencia, pasando por la activación de los mecanismos de defensa vegetal en respuesta a heridas causadas por insectos, varios patógenos y estreses ambientales tales como sequía, baja temperatura y salinidad

(Cheong y Choi, 2003).

Embriones somáticos de azafrán en estadio 4 experimentaron una disminución muy importante en la concentración endógena tanto de PAs libres como conjugadas con respecto a los estados anteriores (Figura 60, capítulo 3). Ya comentamos anteriormente que la adición al medio de cultivo de ácido jasmónico (AJ) resulta imprescindible para conseguir el completo desarrollo de cormos a partir de los embriones que alcanzan el estado 3 de desarrollo. El efecto del AJ se tradujo igualmente en un perfil de PAs específico que pudiera explicar su necesidad en el medio. Como se describió en el capítulo anterior (Figura 60) la presencia de AJ introdujo diferencias importantes en la distribución de PAs en cada una de las fracciones (libre y conjugada). En explantes tratados con AJ 0,5mg/l la fracción libre estuvo representada sólo por diaminas (Put y Cad) mientras que la conjugada incluyó a todas las PAs analizadas en este estudio. Sin embargo, en explantes no tratados con AJ el perfil encontrado de PAs fue diferente e incluyó una reducción drástica en la cantidad total de PAs libres (alrededor de cinco veces menos que con AJ) así como una reducción igualmente importante en Put conjugada y la desaparición de Dap y Spd conjugados, incrementándose sin embargo la concentración de Cad y Spm conjugadas (Figura 60, capítulo 3). También apareció un perfil de PAs distinto a los anteriores cuando se incrementó la concentración de AJ hasta 1mg/l. Esto sugiere que la formación de cormos en los explantes de azafrán es dependiente de una concentración globalmente baja de PAs y apunta igualmente a un papel predominante de las formas libre y conjugada de Put, por encima del resto de PAs. A este respecto hay que comentar que las referencias bibliográficas que incluyen resultados sobre interacciones entre jasmonatos y PAs son todavía escasas. Se conoce, por ejemplo, el efecto del metiljasmonato sobre la inducción de componentes fenólicos en segmentos de hoja de cebada, componentes entre los cuales se identificaron dos PAs conjugadas: N-(E)-4-cumaroil-Put y N-(E)-4-cumaroil-agmatina (Lee y col., 1997). En presente estudio el incremento en la conjugación de Put sobre explantes sin tratar con AJ fue igualmente detectado y también se apreció un importante incremento en la conjugación de Spd, hecho que por otro lado coincide con lo descrito en el caso de *Solanum tuberosum* donde el AJ provocó también incrementos principalmente en la conjugación de Spd tanto en tallos como en raíces (Mader, 1999). Biondi y col. (2001) por su parte, estudiaron el efecto de los jasmonatos sobre los niveles de PAs libres y conjugadas durante la formación de brotes en tabaco. Observaron una disminución de

los niveles de Put, Spd y Spm libres y un incremento de estas mismas PAs en su forma conjugada. También comprobaron que los niveles de Put se incrementaban en tratamientos con dosis inferiores de metiljasmonato pero disminuían cuando la concentración aplicada era de $1\mu\text{M}$ o superior; un resultado similar se apreció en el presente trabajo cuando se aplicó a los embriones 1mg/l de AJ (equivalente a $4.28\mu\text{M}$) (Figura 60, capítulo 3). Análisis de las actividades enzimáticas realizados en este estudio mostraron que los jasmonatos incrementaron la actividad de todos los enzimas metabólicos de PAs, incluyendo los que participan en la biosíntesis de Put (arginina- y ornitina-descarboxilasa), en la biosíntesis de Spd y Spm (SAM-descarboxilasa) y en la oxidación de PAs (diamino-oxidasa).

En el presente estudio Dap solo fue detectada en forma conjugada en los dos tratamientos con AJ. Esto está indicando, sin embargo, que se está produciendo catabolismo de PAs, especialmente de Spd y Spm, mediado por poliamino-oxidasa, ya que es en esas rutas específicamente donde se produce Dap.

4.4.6. Las concentraciones de Put, Spd y Spm tanto libres como conjugadas descritas en el último estadio de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán, difieren de las encontradas en cormos en medio natural

El perfil de PAs libres encontrado en los cormos crecidos en medio natural fue totalmente diferente al encontrado en los embriones en E4 en el presente estudio. En la fracción conjugada las diferencias fueron menores aunque se apreció una concentración inferior en cormos crecidos en campo con respecto a los cormos desarrollados *in vitro*.

La fracción conjugada de PAs parece tener un papel importante en el desarrollo.

El único trabajo que describe la evolución de las PAs en azafrán hasta el momento presente es el de Jirage y col. (1994). En este trabajo se divide el desarrollo de los cormos en seis etapas, desde un estadio de dormancia hasta el crecimiento del cormo con aparición de raíces. En este estudio Put, solo aparece libre en el estadio de dormancia, en el resto del desarrollo del cormo la fracción de Put conjugada va incrementándose hasta ser máxima cuando el cormo está totalmente desarrollado y con raíces. Los niveles de Spd y Spm libres aumentan en las fases de brotación y disminuyen en las fases de crecimiento del cormo. La Spd y Spm conjugadas se comportan de manera opuesta a la fracción libre y son mayores en la fase de crecimiento del cormo. Los niveles totales de PAs son mucho mayores en cormos en

estado de floración que en cormos en estado vegetativo y la diferencia es debida fundamentalmente a la fracción conjugada de PAs.

En la Figura 60, capítulo 3 se muestran los resultados del análisis de cormos en estado natural, observándose una elevada concentración de Spd en la fracción libre (mucho mayor que la de Put). Este resultado coincide esencialmente con lo descrito por Jirage y col. (1994) para el caso de cormos en estado de dormancia, aunque en el presente trabajo no se detectó Spm libre. Con respecto a la fracción conjugada en el presente estudio los niveles encontrados de Put y Spd son muy similares entre sí, al igual que en el trabajo de Jirage y col., sin embargo al contrario que en aquel trabajo no se encontró Spm.

4.4.7 La relación Put/Spd se plantea como un indicador de la capacidad embriogénica del tejido

En nuestro estudio se ha observado una variación de los niveles de unas PAs con respecto a otras, tanto en la fracción libre como en la fracción conjugada, a lo largo del desarrollo de los embriones y con diferentes tratamientos. Uno de los indicadores más empleados para determinar la capacidad embriogénica del tejido es la relación Put/Spd. Generalmente valores Put/Spd elevados se corresponden con una menor capacidad embriogénica y valores Put/Spd bajos se dan en tejidos con elevada capacidad embriogénica. Este indicador se ha empleado en *Solanum melongena* (Yadav y Rajam, 1997) y *Medicago sativa* (Huang y col., 2001). Shoeb y col. (2001) estudiaron el valor del cociente Put/Spd en diferentes genotipos de arroz. Los valores inferiores a 2,3 se encontraron en genotipos con elevada capacidad de regeneración y valores superiores a cinco en genotipos recalcitrantes. Li y Burrit (2003) encontraron también elevados valores de Put/Spd en líneas de *Dactylis glomerata* con baja capacidad regenerativa.

En el presente estudio el valor de la relación Put/Spd fue en general elevado (Tabla 15, capítulo 3), pudiéndose comparar directamente el valor de Put/Spd+Spm dado que los niveles de Spm a lo largo del estudio han sido muy bajos, tanto en la fracción libre como en la conjugada. Estos valores difieren de los obtenidos por Shoeb y col. (2001) en el estudio de diferentes genotipos de arroz. Estos autores proponen una relación directa entre la relación Put/Spd y la capacidad embriogénica de las variedades estudiadas. Esta misma relación podría estar presente en los explantes de azafrán empleados en el presente estudio, pero el valor de la relación es claramente diferente.

En este caso el valor de la relación sería directamente proporcional a la capacidad embriogénica de tejido, como se aprecia claramente en el análisis de la relación Put/Spd conjugada a lo largo de los cuatro estadios de desarrollo (Tabla 15, capítulo 3).

Mediante este estudio de tesis doctoral se ha puesto de manifiesto que existe un patrón característico en la distribución de PAs en cada uno de los estadios de desarrollo de los embriones de azafrán. El patrón varía incluso en un mismo estadio de desarrollo en tejidos con diferentes tratamientos.

En resumen, las PAs han sido implicadas en una gran variedad de respuestas fisiológicas en las plantas. En particular en el ámbito del cultivo *in vitro* son numerosas las referencias de la participación de estos compuestos en diferentes facetas de la regeneración de plantas. Así:

1. Una alta concentración de PAs, particularmente en su fracción libre, se observa comúnmente en tejidos que están en proceso de embriogénesis somática (Santanen y Simola, 1992; Yadav y Rajam, 1997; Minocha et al., 1999; Kevers y col., 2000).
2. La reducción del nivel de PA libres mediante la aplicación de inhibidores específicos suele inhibir de forma proporcional la embriogénesis somática (Hadrami y D'Auzac, 1992; Kevers y col., 2000).
3. La adición de PAs al medio también se ha comprobado que mejora la tasa de embriogénesis somática en diferentes casos (Rajesh y col., 2003), incluso en algunas plantas en las que sin PAs no los producían (Hadrami y D'Auzac, 1992).
4. Otros estudios sugieren que el metabolismo de PAs podría estar implicado en la competencia de los explantes para la embriogénesis somática en muchas especies (Santanen y Simola, 1994), siendo tanto el nivel endógeno total como las relaciones de PA individuales importante para las primeras etapas de la embriogénesis somática (Yadav y Rajam, 1998; Huang y col., 2001; Schoeb y col., 2001; Monteiro y col., 2002; Li y Burritt, 2003).
5. La manipulación por transgénesis de la ruta biosintética de las PAs también ha demostrado la importancia de las PAs para la embriogénesis somática. Así células de zanahoria con elevados niveles de Put debido a la sobreexpresión de un ADNc para ornitina-descarboxilasa (ODC) de ratón, mostraron una mayor competencia para la embriogénesis somática que células no transformadas (Bastola y Minocha, 1995).

Los resultados del presente estudio son coherentes con la afirmación 4, ya que: a) el nivel de PA conjugadas es mayor que el de libres en todo el proceso de regeneración excepto en la etapa 1 (y ya se sabe que la conjugación es una faceta más del metabolismo) y b) Dap desaparece libre en la etapa 2 pero aparece conjugado en mayor concentración, señal de un aumento en la actividad del enzima PAO, lo que coincide con los resultados de Santanen y Simola (1994).

Los resultados de este trabajo, sin embargo, matizan la afirmación 1 y se oponen a la 2. Hay, efectivamente un aumento en PA entre las etapas 1 y 2, pero este aumento se debe en este caso a las PAs conjugadas, mientras que las libres tienden a descender durante todo el proceso de regeneración.

4.5. PRIMEROS ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN AZAFRÁN

La transferencia de genes de una especie a otra tiene ventajas muy en el sistema agrícola instaurado en la actualidad. De los dos métodos básicos de transformación genética de tejidos se generalizó, inicialmente, el empleo de *Agrobacterium tumefaciens* en especies que eran infectadas en el medio natural con esta bacteria y grupos afines. La transferencia directa de genes por medios físicos se empleaba en el resto de especies no susceptibles a la infección con *Agrobacterium*. Con el paso de los años se ha visto que los dos mecanismos pueden ser válidos para todo tipo de plantas. Se han realizado modificaciones en los sistemas de infección y en el genoma de *Agrobacterium* que facilitan la infección incluso de plantas monocotiledóneas.

4.5.1. La transferencia directa de genes se plantea como un sistema adecuado para la transformación de todo tipo de especies vegetales

Dentro de los diversos métodos físicos empleados actualmente en la transferencia directa de genes la transformación por biolística es de los más empleados en tejidos de todo tipo. En la transformación de protoplastos se emplean técnicas de fusión (Krens y col., 1982; Dix y col. 1995).

La transformación mediante biolística permite la introducción de los genes de interés en todo tipo de células independientemente de las características de éstas. Esta peculiaridad la convierte en una técnica apropiada en especies reacias a ser transformadas mediante otros sistemas.

4.5.1.1 El vector de transformación y sobretodo el promotor que contiene pueden determinar en gran medida el éxito o fracaso de la transformación

En este trabajo se emplearon dos vectores diferentes y se testaron diferentes condiciones de disparo para determinar las condiciones óptimas de transformación. La construcción pBIN contiene el promotor CaMV35S. Esta construcción tanto con el gen testigo GUS como con el GFP es muy efectiva en plantas dicotiledóneas pero su actividad en monocotiledóneas es menor. McElroy y col. (1991) aislaron el promotor de actina de arroz, el cual ofrece un resultado más satisfactorio en transformación de monocotiledóneas por este sistema, por otro lado Kamo y col. (1999) estudiaron la

transformación en diversas partes de plantas de gladiolo, determinando que el CaMV35S era el más efectivo de los ensayados en transformación con el gen GUS. En el presente estudio se constató la transformación de embriones de azafrán en E1, con pBIN-GUS. La transformación con este mismo vector pero empleando GFP como gen testigo no pudo comprobarse, ya que los callos embriogénicos acumulan gran cantidad de sustancias que poseen la capacidad de emitir fluorescencia. Este hecho unido a la baja incidencia de la transformación indujo a confusión a la hora de observar regiones transformadas. Otro promotor empleado fue el EM; se trata de un promotor de semilla que resultó positivo en la transformación transitoria de callos embriogénicos de azafrán en E1 y también en cormos de azafrán. Los promotores específicos de proteínas de reserva, por ejemplo, se han empleado con éxito en numerosas especies funcionando por lo general como promotores más fuertes que el 35S y con actividad específica (Marraccini y col., 1999, Truksa y col., 2003). Dentro del cormo, las regiones transformadas fueron las zonas de las yemas meristemáticas, regiones de crecimiento activo donde se está produciendo división y expresión de ADN. En este caso se aprecia que un promotor genérico como el CaMV35S no es capaz de expresarse de manera detectable en un órgano de reserva de la planta de azafrán, mientras que un promotor más específico da una expresión detectable.

4.5.1.2 La cantidad de ADN y el tamaño y tipo de las micropartículas afectaron a la eficacia de transformación

Además de los parámetros característicos del equipo empleado en la transformación existen una serie de factores que pueden afectar a la eficacia de transformación.

Rasco-Gaunt y col. (1999) realizaron un estudio muy completo de los parámetros implicados en la transformación por biolística en trigo. Se testaron diferentes cantidades de ADN (cantidad de ADN empleada en cada disparo) y de micropartículas por disparo, la concentración y pH de CaCl_2 , concentración de Spd y compuestos como el glicerol o PEG como permeabilizadores. Observaron que excepto el equilibrio entre cantidad de ADN y número de micropartículas el resto de parámetros no ofrecían grandes diferencias.

En el bombardeo de azafrán se empleó el protocolo típico del equipo y se apreciaron algunas diferencias en función del tipo y tamaño de las partículas empleadas (solo resultaron efectivas en transformación las micropartículas de oro de 1 μm de diámetro).

Este hecho se ha observado en general en transformación de algunas monocotiledóneas (Morrish y col., 1993). Las partículas de 1µm de diámetro se seleccionaron como óptimas en transformación de callos embriogénicos y cormos de azafrán llegándose al mismo resultado que Schöpke y col. (1997) en transformación de cacahuete. Por contra Rasco-Gaunt y col. (1999) no apreciaron diferencias en un rango de 0,4 a 1,2µm en transformación de trigo.

4.5.1.3. Los parámetros de bombardeo varían de unas especies a otras

Otro grupo de parámetros importantes son los propios del equipo, presión de aceleración (determinada por la presión que soporta el disco de ruptura), presión de vacío de la cámara (que en este caso fue constante 28Hg es lo más frecuentemente empleado) y distancia de disparo. En algunos casos se cuenta como otro factor el número de disparos efectuados sobre un mismo explante, pero en nuestro estudio este método se empleó únicamente para incrementar la cantidad de ARN (mayor expresión) presente en un momento puntual. Como se aprecia en la Figura 67 el resultado óptimo de obtuvo sobre callos embriogénicos a 12cm de distancia y con 900 o 1100psi de aceleración. Rasco- Gaunt y col. (1999) establecieron entre 650 y 1100psi de aceleración y 5.5cm de distancia para la máxima expresión GUS en trigo. Barandiaran y col. (1998) determinaron como valores óptimos para la transformación de *Allium* entre 1100 y 2000psi de presión y 3cm de distancia. En especies más próximas al azafrán como *Lilium* las condiciones óptimas fueron 1100psi y 6cm de distancia (Watad y col., 1998).

*4.5.1.4 Las características del material vegetal determinan la expresión del ADN introducido y también la expresión endógena del gen de la **b**-glucuronidasa*

El estado del material vegetal en el momento de la transformación juega un papel fundamental en la expresión del ADN introducido. Existen numerosas variaciones con respecto al tratamiento previo del material que permiten una expresión óptima tanto de genes testigo como de posteriores genes de interés. En muchos casos se emplea un pretratamiento osmótico, sacarosa al 6 ó 9% (Rasco-Gaunt y col., 1999), combinación de sorbitol y manitol (Schöpke y col., 1997), o pretratamientos con nucleasas para evitar

la degradación del ADN foráneo (Barandiaran y col., 1998). En la transformación de callos embriogénicos de azafrán los pretratamientos osmóticos provocaron un exceso de estrés en el material por lo que no incrementaron la eficacia de transformación.

Pese a la ausencia de actividad de la β -glucuronidasa en los tejidos de planta (Jeferson y col., 1987), en el estudio de transformación de diferentes tejidos en azafrán se ha encontrado una actividad basal de este enzima. La actividad endógena GUS se ha encontrado en tejidos muy diferentes de diferentes especies (Hu y col., 1990). En nuestro estudio fue más patente en las raíces adventicias y en algunos callos. En estudios de ajo Barandiaran y col. (1998) encontraron actividad endógena GUS también en callos, en dientes tanto maduros como inmaduros y en hojas. La estrategia empleada para evitar las posibles confusiones es limitar las incubaciones de revelado a 12h. Por lo general la coloración debida a una actividad endógena aparece en forma continua y es fácilmente distinguible de los puntos concretos de transformación debidos a transformación por bombardeo, además el color azul es más tenue. La coloración continua puede enmascarar una transformación poco efectiva.

4.5.1.5. En la transformación de protoplastos es fundamental contar con una concentración de protoplastos adecuada

Los protoplastos son células muy frágiles, generalmente se obtienen a partir de suspensiones celulares o de cultivo de hojas. La dificultad en el establecimiento de suspensiones de células de azafrán y la escasez de hojas debido al corto periodo en el que se desarrollan de manera natural, determinó la necesidad de obtener los protoplastos a partir de masas de callos embriogénicos y de cormos. Oliveira y col. (1991) establecieron protoplastos a partir de callos de Kiwi obteniendo unos rendimientos de 10^5 /ml. En el presente estudio los rendimientos fueron inferiores (10^4 /ml, ver Figura 72A, capítulo 3); ésta puede ser una de las causas de las bajas frecuencias de transformación y dificultades en la regeneración.

Isa y col. (1990) fueron los primeros en establecer cultivos de protoplastos de azafrán obteniendo protoplastos a partir de callos, con unos rendimientos superiores. La regeneración de plantas a partir de estos protoplastos se realizó por cultivo con bolas de alginato en cultivos nodriza.

La transformación de protoplastos como ya se ha mencionado sucedió con una frecuencia muy baja en el presente estudio (frecuencias del 0,33% con pBIN-GUS y

0,033% con pBIN-GFP. Figura 72B, capítulo 3). Este hecho impidió cualquier ensayo de regeneración de plantas a partir de un protoplasto transformado.

Los protoplastos a partir de cormo de azafrán presentaron diversos problemas, el primero y más importante fue que al tratarse de material del campo existía siempre cierto grado de contaminación. Por otra parte este material contiene gran cantidad de almidón que se libera al disgregar el tejido y hace muy dificultoso su manejo.

4.5.2. La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el sistema ideal para una transformación estable

La transformación mediada por *Agrobacterium* presenta como ventaja fundamental que se trata de un mecanismo dirigido. Se controla el número de copias y será transformada de forma estable cualquier célula que infecte la bacteria. A diferencia de la biolística donde se espera a que por azar se produzca la integración del ADN extraño en el genoma de la célula, en este tipo de transformación el mecanismo de infección de *Agrobacterium* asegura la integración. Como ya se comentó en la introducción *A. tumefaciens* infecta de forma natural plantas dicotiledóneas, pero se ha empleado con éxito en numerosas monocotiledóneas tales como cereales (Hiei y col, 1994, Ishida y col., 1996, Cheng y col., 1998) e incluso en plantas con cormo como el gladiolo (Graves y col., 1987, Kamo, 1997). En azafrán se emplearon callos embriogénicos en estadio 1 y cormos (al igual que en la transferencia directa de genes).

4.5.2.1. Parámetros importantes y estrategias de infección

El vector en este caso es la cepa C-36 de *Agrobacterium* transformada con la construcción pBIN-GUS. Además del tipo de explante las características de la cepa de AT empleada son muy importantes. Hiei y col. (1997) establecieron los cinco factores implicados en la eficacia de transformación de arroz por medio de AT. La inducción de genes *vir*, la activación de la división celular en los tejidos diana, la composición del medio, la cepa de *agrobacterium*, el tipo de vector y el genotipo a transformar.

El mecanismo de infección empleado generalmente es la infiltración del tejido con una suspensión de la bacteria en una D.O. de crecimiento adecuada. La D.O. efectiva en nuestro estudio se encuentra entre 0,2 y 0,8. Cardoza y col. (2003) transformaron *Brassica napus* L. mediante cultivo de A.T. D.O. 0,8. En este trabajo el material (hipocótilos) se preconditiona durante 72 horas en medio de cultivo y la eficacia de

transformación se incrementa significativamente. En estudios en *Populus* la D.O osciló entre 0,3 y 0,4 (Han y col., 2000), alargándose el precultivo hasta 7 días.

El azafrán en estas condiciones tiene una transformación óptima con una D.O. de crecimiento de la bacteria de 0,5, como se puede apreciar en la Figura 67, capítulo 3. Cheng y col. (2003) emplearon con éxito esta misma concentración de A T en la transformación de trigo, realizaron un barrido de concentraciones de bacteria entre 0,1 y 2 concluyendo que la respuesta óptima se producía con D.O=0,5.

Además de infiltración, que es el método tradicional de infección, se empleo la infección mediante sonicación. Este sistema se ha empleado con éxito en otras especies (Trick y col., 1997, Santarém y col., 1998). En nuestro estudio este sistema ofreció mejores resultados que la infiltración con el mismo nivel de crecimiento bacteriano.

El resultado se debe a que por medio de la sonicación la bacteria es capaz de penetrar totalmente en el tejido de una forma sencilla y llegar a más células que con la infiltración. Además la infiltración del tejido puede provocar más daño, de forma que parte de las células infectadas por AT en un primer momento estarán dañadas.

Dado que el mecanismo natural de patogenicidad de *A. tumefaciens* es la infección por heridas se realizaron estas en el tejido con ayuda de un bisturí para comprobar el efecto en el grado de transformación del tejido. En callos de azafrán la transformación por este método fue muy débil. En cormos no se produjo transformación. Otros autores facilitan la entrada de la bacteria en el tejido realizando heridas además de con un bisturí por medio de bombardeo con micropartículas vacías (Babu y col., 2000). Este sistema provoca heridas en grandes cantidades y de muy pequeño tamaño y ha dado muy buenos resultados en transformación de gladiolo.

Una mezcla de los dos sistemas de transformación (biolística y *Agrobacterium*) fue lo que Cordero de Mesa y col. (2000) emplearon en transformación de frambuesa. Por medio del bombardeo con AT se logra hasta un 96.2% de explantes gus+ frente a un 26.6% obtenido por biolística y un 58.3% en transformación mediada por A.T. Además por este mecanismo se pueden obtener transformantes estables.

Fenómenos como la desecación, tratamientos antinecróticos, pretratamientos osmóticos etc. afectan al reparto del ADN-T y a la estabilidad de la transformación. El conocimiento de las bases moleculares que rigen estos procesos puede facilitar la

aplicación de este tipo de tratamientos en diversas monocotiledóneas (más reticentes a la transformación) (Cheng y col, 2004).

4.5.2.2. Selección de transformantes

La selección de transformantes en una etapa clave en transformación estable del tejido. El disponer de un mecanismo de selección fiable nos permitirá finalmente obtener plantas transgénicas. El marcador de selección del vector empleado fue la resistencia a kanamicina. El nivel de kanamicina con efecto selectivo en callos embriogénicos de azafrán fue 100mg/l (Figura 68, capítulo 3). Esta misma concentración se ha empleado en gladiolo (Babu y col., 2000) aunque en otras especies las concentraciones son inferiores (25mg/l en frambuesa, Cordero de Mesa y col., 2000). Pese a poder establecer un nivel de kanamicina para el cual los callos embriogénicos de azafrán no crecen y mueren, la respuesta de explantes transformados fue muy heterogénea para diferentes concentraciones de kanamicina.



5.- CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han estudiado los embriones somáticos de azafrán a diversos niveles. En primer lugar se procedió a optimizar el desarrollo los embriones hasta plántulas, analizando el comportamiento del tejido en sistemas de inmersión temporal y posteriormente se caracterizaron los embriones. Ha sido realizada una división de los estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán en función de un estudio histológico y morfológico desde la inducción hasta la maduración en plántulas. Se ha analizado en cada uno de estos estadios la respuesta del sistema enzimático antioxidante y el grado de peroxidación lipídica y las variaciones en los niveles endógenos de varias poliaminas (Dap, Put, Cad, Spd y Spm). Por último se realizaron ensayos preliminares en los dos sistemas de transformación de material vegetal: biolística y transformación mediada por *Agrobacterium*.

Del estudio realizado con embriones somáticos de azafrán se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- El crecimiento de los callos embriogénicos fue significativamente mayor en medios con ANA que en medios con 2,4D. El 2,4D era necesario para la formación de los embriones somáticos pero inhibía en cierto grado su desarrollo.
- 2.- El cultivo en Sistemas de Inmersión Temporal mejoró considerablemente el rendimiento de los callos embriogénicos de azafrán en fase de multiplicación. Con el empleo de estos sistemas se multiplicó por cuatro el rendimiento obtenido en medio sólido, además asociado a los SIT hubo un ahorro considerable de espacio y medio dedicados al cultivo.
- 3.- La combinación ANA, BAP (2mg/l BAP y 0,05mg/l ANA) resultó óptima en el desarrollo de los embriones somáticos de azafrán y el paso al estadio de desarrollo del polo apical (monopolar).
- 4.- La putrescina y el tiosulfato de plata indujeron la polaridad en los embriones somáticos de azafrán. El tiosulfato de plata en una concentración de 0,6µm provocó además un crecimiento muy significativo de los callos embriogénicos con respecto al control. El tiosulfato de plata podría emplearse en los tejidos con un doble objetivo: por

un lado favoreciendo la fase de multiplicación del material embriogénico y por otro induciendo la maduración de los embriones somáticos

5.- La adición de ácido jasmónico (0,5mg/l) al medio de cultivo favoreció la maduración de los embriones. Tras la formación del polo apical el AJ indujo el desarrollo del polo radicular y formación del corno. Además se constató un efecto sinérgico del AJ con los incrementos en la concentración de sacarosa del medio de cultivo. El AJ se encargaría de activar rutas de acumulación de reservas, el incremento posterior de la concentración de sacarosa sirve de sustrato a esta acumulación de reservas y se produce por tanto un engorde del corno de azafrán en esta etapa.

6.- Mediante el estudio histológico y morfológico de los embriones de azafrán a lo largo de su desarrollo se establecieron cuatro estadios. Estos cuatro estadios observados en los embriones somáticos de azafrán, a excepción del estadio monopolar, son muy similares a los descritos en especies próximas. El estadio monopolar se ha denominado en otras especies como estadio globular tardío. El establecimiento de los estadios de desarrollo de los embriones de azafrán ha permitido posteriores estudios de caracterización.

7.- Los callos embriogénicos de azafrán mostraron una asombrosa capacidad embriogénica durante más de ocho años. Esta capacidad embriogénica de los callos embriogénicos de azafrán es muy superior a las descritas en especies relacionadas incluso en medios de cultivo con niveles de 2,4 D diez veces superiores.

8.- El grado de peroxidación lipídica de los embriones somáticos de azafrán fue en aumento a lo largo del desarrollo, este resultado plantea la implicación del estrés oxidativo en el proceso de embriogénesis. Los radicales libres originados por peroxidación lipídica podrían tener actividades citotóxicas y citoactivas que interaccionan con el estado de desarrollo del embrión y con el sistema antioxidante.

9.- El sistema antioxidante, más concretamente la SOD como vía de activación de este sistema, presenta un patrón de expresión característico a lo largo del proceso de embriogénesis somática por lo que está íntimamente relacionado con él y podría

plantearse una regulación de la embriogénesis somática del azafrán por parte del sistema antioxidante.

10.- Las poliaminas analizadas conforman un patrón que es característico de cada uno de los estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán. Este patrón varía incluso cuando se modifica el tratamiento en un mismo estadio de desarrollo. Podrían emplearse por lo tanto como marcadores específicos del proceso de embriogénesis somática en azafrán.

11.- En el establecimiento de la polaridad del embrión (E2) se produce un incremento de los niveles de Dap y Put conjugadas, además el Dap libre desaparece casi totalmente. Este incremento en las poliaminas conjugadas sugiere la importancia de la conjugación como parte del metabolismo de poliaminas en procesos como la embriogénesis.

12.- Se han establecido las condiciones óptimas para el bombardeo (distancia y presión de disparo y tipo de partículas) de callos embriogénicos de azafrán. Pese a esto las condiciones descritas se limitan a un tipo de tejido, vectores y sistema de transformación particulares.

13.- La transformación mediada por *Agrobacterium* resultó más eficaz cuando el tejido era sonificado con una suspensión de la bacteria. Además se comprobó que la eficacia de infección estaba relacionada con la D.O. del cultivo de *Agrobacterium* empleado. La transformación mediada por *Agrobacterium* se plantea como un sistema eficaz de transformación estable de los tejidos y podría ser el sistema por el que obtener el primer azafrán mejorado genéticamente.



ANEXOS

ANEXO I

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Explantes empleados en el cultivo de plantas con bulbos y cormos.....	15
Tabla 2. Genes cuya regulación se ha detectado durante el proceso de embriogénesis.....	38
Tabla 3. Combinaciones de reguladores empleadas en los estudios de multiplicación...	55
Tabla 4. Combinaciones hormonales empleadas en el primer ensayo de diferenciación: BAP/TDZ.....	57
Tabla 5. Combinaciones hormonales empleadas en el segundo ensayo de inducción de diferenciación.....	58
Tabla 6. Concentraciones empleadas de cada uno de los diferentes compuestos y medio de multiplicación con el que se combinan.....	59
Tabla 7. Combinaciones de ácido jasmónico ensayadas en formación del cormo.....	61
Tabla 8. Ensayo con JA sobre material procedente de dos tratamientos diferentes.....	62
Tabla 9. Ensayo con MS y ½ MS de compuestos para mejorar el crecimiento en medio líquido de los explantes.....	66
Tabla 10. Combinaciones hormonales ensayadas en multiplicación en SIT.....	67
Tabla 11. Diferentes fuentes de carbono empleadas en SIT.....	68
Tabla 12. Porcentaje de inducción de callogénesis en 8 y 12 semanas de meristemos centrales y laterales de cormo de azafrán.....	93
Tabla 13. Evolución de las características de los callos a lo largo de un mes.....	99
Tabla 14. Porcentaje de diferenciación inducida en medios con 0,1mg/l de AJ en relación al control sin AJ.....	104
Tabla 15. Diferentes ratios indicadores en poliaminas de plantas.....	148
Tabla 16. Condiciones de disparo ensayadas para transformación de diferentes tejidos en azafrán.....	152

ANEXO II

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes variedades de <i>crocus vernus</i> creciendo de forma silvestre, A1. <i>Crocus cartwrightianus</i> , cormo con flor color púrpura, A2, y fruto desarrollado, A3. <i>Crocus sativus</i> , cormo con flor y raíces, B1, y detalle de una flor, B2.....	3
Figura 2. Evolución en España desde 1985 a 1999 de la superficie dedicada al cultivo de azafrán y de la producción de estigma tostado. Fuente: Anuario M.A.P.A.....	6
Figura 3. Labores de recogida del azafrán en el campo, A. B y C son respectivamente flores de <i>Crocus sativus</i> y de <i>Lythrum salicaria</i> . D es el sello de calidad que el consejo regulador pone a toda la producción que cumple la normativa establecida para el azafrán de calidad Mancha.....	9
Figura 4. Representación de una familia durante el desbrizado del azafrán en una cocina antigua. Fotografía del museo del Azafrán en Monreal del Campo (Teruel).....	11
Figura 5. Esquema básico de micropropagación en una bulbosa.....	14
Figura 6. A1 y A2, diferentes sistemas de cultivo en medio líquido. B1, sistema adecuado a partir de una modificación de unidades de filtro Nalgene, B2, vista de callos en crecimiento. B3, Rita's en funcionamiento.....	23
Figura 7. Esquema explicativo de los dos tipos de embriogénesis somática.	25
Figura 8. Fuentes de AOS en plantas.....	39
Figura 9. Ciclo del peróxido de hidrógeno en plantas.....	40
Figura 10. Ruta de síntesis de las poliaminas más abundantes donde se señalan puntos importantes de control.....	43
Figura 11. Esquema explicativo de los dos mecanismos básicos de transformación genética en plantas.....	48
Figura 12. Partes de la planta de azafrán empleadas en cultivo <i>in vitro</i>	51
Figura 13. Esquema básico de funcionamiento de los SIT.....	65
Figura 14. Fases o estadios en los que se divide el desarrollo de los embriones somáticos de azafrán.....	70

Figura 15. Plásmidos empleados en los ensayos de transformación genética. El plásmido EM-GUS que no aparece en la figura es similar al pBI121 con un promotor EM en lugar de CaMV 35S. Las secuencias NOS (pro y ter) son imprescindibles para la integración del vector en el plásmido Ti de agrobacterium.....	84
Figura 16. Secuencia del gen de la β -glucuronidasa.....	85
Figura 17. Desarrollo secuencial de callos a partir de regiones meristemáticas del centro del corno de azafrán (A1-A3). Desarrollo secuencial de callos a partir de yemas laterales de corno de azafrán (B1,B2). Las flechas señalan los nódulos embriogénicos	93
Figura 18. A, evolución del peso fresco de los callos en los diferentes tratamientos durante tres semanas. B, comparación del aumento en peso en luz y oscuridad en tres semanas de los callos en el primer ensayo de multiplicación.....	96
Figura 19. Incremento en peso de callos en multiplicación con ANA y 2,4D en tres semanas.....	96
Figura 20. Medias de aumento en peso de callos en multiplicación en luz y en oscuridad en los medios ND1 y ANA.....	97
Figura 21. Callos de azafrán creciendo en medio con NAA (A) y en medio con 2.4D (B).....	98
Figura 22. Crecimiento de los callos embriogénicos en medios con diferentes niveles de AJ y ANA combinados con BAP, A1 o TDZ. B1. Diferenciación de embriones polares en medios con diferentes niveles de AJ y ANA combinados con BAP, A2 o TDZ, B2.....	100
Figura 23. Primer ensayo de desarrollo del polo apical de los embriones. A, explante diferenciándose en medio con BAP (medio 24). B, explante con desarrollo apical en medio con TDZ (medio 18).....	101
Figura 24. Respuesta de los explantes a las cuatro (A) y ocho semanas en cultivo (B) en los medios 1-12.....	102
Figura 25. Fotografías A: desarrollo del polo apical en el segundo ensayo de diferenciación, embriones desarrollándose en medio 4, A1, 5, A2 y 7, A3. Fotografías B: ensayo de diferenciación con AJ, B1 y B2, callos embriogénicos con embriones dipolares en medio con AJ, mb indica inicio de modificación basal, B3, embriones dipolares en un callo control.....	104
Figura 26. A, crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de TIBA y NPA. B, crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de AVG y BCIP.....	106
Figura 27 Incremento en peso fresco y desarrollo de los embriones con diferentes concentraciones de Ácido salicílico, A y B, y Cloruro de cobalto, C y D.....	108

Figura 28. Incremento en peso fresco y desarrollo de los embriones con diferentes concentraciones de Putrescina, A y B y Tiosulfato de plata, C y D	109
Figura 29. Respuesta de los embriones en el primer ensayo maduración. A, % de cormos en los medios 1, 2, y 3 y B, caracterización de la maduración de embriones en los medios 2 y 3, n=10.....	111
Figura 30. A y B, callos embriogénicos con embriones dipolares al cabo de cuatro semanas de tratamiento, en medio con ácido salicílico, A, y con putrescina, B. C y D, cormos en desarrollo, medios 2 y 3 respectivamente.....	112
Figura 31. A, Formación secuencial de plántulas en medio MAD 1, respuesta en 15 y 30 días de tratamiento. B, diferentes respuestas al tratamiento con AJ en función del grado de desarrollo de los explantes.....	113
Figura 32. Explantes F.I. iniciales, A y al pasados 30 días en medio 3, B (se aprecia el desarrollo del polo apical en la mayor parte de los explantes). Explantes F.F, iniciales, A y tras 30 días en medio 3, B (hay una maduración de los embriones en la mayor parte de los explantes).....	115
Figura 33. Respuesta de los explantes en 15 y 30 días al tratamiento combinado AJ/ Sacarosa: Tratamientos 1, A, y 2, B, primera fase.....	115
Figura 34. Valores medios de incremento en peso, longitud y grosor de los explantes desarrollados hasta plantas en los tratamientos 1, A, y 2, B.....	117, 118
Figura 35. Explante creciendo en tratamiento 1, explante tipo d al cabo de 15 días de cultivo, A. Respuesta final de los explantes al tratamiento 1, B, y tratamiento 2, C...	119
Figura 36. Respuesta de los embriones en E2 en función del pretratamiento con AJ..	121
Figura 37. Desarrollo de cormos y microcormos en función del nivel de GA ₃ , A y en función del nivel de GA ₃ y el pretratamiento aplicados, B.....	121
Figura 38. Detalle de los sistemas de inmersión temporal en funcionamiento.....	122
Figura 39. Efecto de los diferentes compuestos ensayados sobre la proliferación del material embriogénico en SIT.....	122
Figura 40. Estudio de la respuesta con diferentes concentraciones de paclobutrazol.....	123
Figura 41. Respuesta de los callos embriogénicos al cultivo en SIT con diferentes combinaciones hormonales. El factor de multiplicación de obtiene: Incremento en peso fresco en 4 semanas /peso fresco inicial.....	124

Figura 42. Comparación entre callos embriogénicos creciendo en un medio sin PVP (A) y en un medio con 0.5mg/l de PVP (B). Comparación entre callos embriogénicos creciendo en medio sin PAC (C) y en medio con 1mg/l de PAC (D). Se aprecia que en el medio sin PAC el grado de hiperhidratación es mayor.....124

Figura 43. Respuesta al primer ensayo de maduración de los embriones en SIT.....125

Figura 44. Efecto de las diferentes fuentes de carbono en el crecimiento y desarrollo de los embriones en SIT.....126

Figura 45. Material creciendo en sistemas de inmersión temporal. A, diferenciación de los nódulos en el primer ensayo de diferenciación en el medio 2. B, explantes con desarrollo de brotes con 2% de sacarosa.....126

Figura 46. Porcentaje de crecimiento de los callos embriogénicos en los dos tipos de sistemas. El porcentaje de crecimiento se calcula, peso final menos-peso inicial/ peso inicial (pf-po/po).....127

Figura 47. A, tuberización obtenida a partir de callos embriogénicos de azafrán. B y C, desarrollo anormal del programa floral.....129

Figura 48. A, Micrografía electrónica de un callo embriogénico, mostrando un embrión proglobular, la barra representa 200 micras. B, Micrografía óptica de un corte de callo en fase de formación de los nódulos, las flechas señalan los nódulos embriogénicos, la barra representa 400 micras. C micrografía electrónica de las células que conforman los nódulos embriogénicos (C1) y de la región de transición entre zonas embriogénicas y no embriogénicas (C2), la barra representa 5 micras.....132

Figura 49. A-F. Embriogénesis somática en azafrán. A, B, C y D, callos embriogénicos con varios estadios de desarrollo (E1, globular, E2, monopolar, E3, dipolar). E, Fotografía de un corno desarrollado completamente, embrión en estadio 4. La barra representa 0,5cm. F, fotografía de una plántula, embrión en estadio 4. La barra representa 2cm.....133

Figura 50. 1-5. Estudio histológico de la embriogénesis somática en azafrán. A Sección de callo nodular con tejido embriogénico (TE). B Embriones somáticos en estadio monopolar (EM). C Embrión somático dipolar (ED) con protodermis diferenciada (PD). D Embrión somático globular aislado (ED). E embrión somático maduro en sección histológica longitudinal mostrando sus polos apical (PA) y radicular (PR) con conexiones vasculares diferenciadas (CV).....135

Figura 51. Niveles de peroxidación lipídica en los cuatro estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán.....136

Figura. 52. Ascorbato peroxidasa (APX) sensible a PHMB, A. APX insensible a PHMB, B, y actividad catalasa (CAT), C, durante los estadios de desarrollo de los embriones somáticos.....137, 138

Figura 53. Actividades ácido monodeshidroascorbico reductasa (MDHAR) y ácido deshidroascorbico reductasa (DHAR) medidas en los cuatro estadios de desarrollo de los embriones somáticos.....	139
Figura 54. Actividades enzimáticas de la glutatión reductasa (GR) superóxido dismutasa (SOD) medidas a lo largo del desarrollo de los embriones (E1- E4).....	140
Figura 55. Isoformas de la SOD detectadas in los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos de azafrán, A. Variación de la actividad de las isoformas Mn-SOD y Cu-SOD en los cuatro estadios.....	141
Figura 56. Niveles de las diferentes poliaminas analizadas en E1 con dos diferentes auxinas, 2,4D y ANA.....	143
Figura 57. Poliaminas libres y conjugadas en los cuatro estadios.....	144
Figura 58. Niveles de cada una de las poliaminas libres analizadas en los cuatro estadios.....	145
Figura 59. Niveles de cada una de las poliaminas conjugadas analizadas en los cuatro estadios.....	146
Figura 60. Niveles de las poliaminas analizadas, tanto libres (A) como conjugadas (B), en E4 con diferentes tratamientos y en cormos naturales.....	148
Figura 61. Expresión transitoria en diferentes explantes de azafrán en función del vector empleado y de la distancia de disparo.....	151
Figura 62. Fotografías de dos callos E1 transformados con la construcción pBIN-GUS, las flechas señalan regiones transformadas con puntos de color azul, A, 12cm de distancia, B, 9cm de distancia.....	152
Figura 63. A y B micrografías ópticas obtenidas mediante scuasch o aplastamiento de zonas de callos con puntos transformados con pBIN-GUS, las flechas señalan los grupos de células coloreadas. La barra representa 400 micras.....	153
Figura 64. A, callo transformado con EM-GUS, las flechas señalan las regiones con transformación positiva. B, cormo de azafrán transformado con EM-GUS, las flechas señalan también regiones transformadas, m, regiones meristemáticas del cormo (yemas).....	154
Figura 65. Tinción generalizada debida a la actividad endógena de la β -glucuronidasa en A, callos de meristemos de cormo de azafrán, B y C, raicillas del cormo de azafrán.....	155

Figura 66. Bandas correspondientes a la β -glucuronidasa (500pb) expresándose en callos E1 transformados, las flechas señalan las bandas positivas. Calles m, marcador de peso molecular, 1, 2, 3 y 5 diferentes actividades enzimáticas que resultaron negativas, y 4 bandas detectadas al amplificar meristemas de corno de azafrán contaminados con los extremos del gen GUS.....156

Figura 67. Transformación de callos de azafrán en función de la D.O. del cultivo de *Agrobacterium* y de la estrategia de infección.....156

Figura 68. % de supervivencia de los callos con diferentes concentraciones de kanamicina.....157

Figura 69. Respuesta de los explantes a las diferentes concentraciones de kanamicina.....158

Figura 70. Callos de meristemo de azafrán en E1 infiltrados y sonicados con *Agrobacterium* D.O 0,53 y 0,6 respectivamente. A y B callo infiltrado, las flechas indican zonas amplias donde ha penetrado la bacteria, la barra representa 800 micras. C y D callo sonificado vista de las zonas transformadas (señaladas con flechas), la barra representa 400 micras. Las micrografías ópticas (B y D) se han realizado mediante scuasch o aplastamiento del tejido transformado.....159

Figura 71. Cormos pequeños de azafrán, infiltrado, A, y sonificado, B.....160

Figura 72. A, formación de protoplastos por digestión de la pared celular en callos de corno de azafrán y en cormos obtenidos del medio natural, representación de protoplastos viables tras tinción con DAPI. B, eficacia de transformación de protoplastos de callo de azafrán con los vectores pBIN-GUS y pBIN-GFP.....161, 162

Figura 73. Micrografía óptica de protoplastos obtenidos a partir de tejido de callo de meristemo de azafrán (A) y de corno de azafrán (B), en ambos casos la flechas señalan la membrana de la célula, el interior celular y algunos restos celulares, la barra representa 400 micras. C y D, micrografías ópticas de protoplastos transformados, A, con pBIN-GUS y B con pBIN-GFP, las flechas señalan las regiones en las que se está produciendo expresión del gen testigo. La barra representa 400 micras.....163

ANEXO III

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

1. Ensayos de multiplicación.

-En un primer análisis de los medios B, C, D, E, F y N (columnas 1-6 respectivamente) por medio de un ANOVA de un factor (incremento en peso fresco).

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	10	1,16	0,116	0,00967111
Columna 2	10	1,3	0,13	0,01171111
Columna 3	10	2,16	0,216	0,02209333
Columna 4	10	1,32	0,132	0,00797333
Columna 5	10	2,33	0,233	0,01244556
Columna 6	10	2,78	0,278	0,03728444

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,22504833	5	0,04500967	2,66911411	0,03154602	2,38606646
Dentro de los grupos	0,91061	54	0,01686315			
Total	1,13565833	59				

Significativo 2,66>2,38

-Test de comparación de medias entre el control (N, variable 2) y el medio (D, variable 1) datos totales, luz y oscuridad.

PRUEBA T PARA MEDIAS DE DOS MUESTRAS EMPAREJADAS

D Y N TOTALES

	Variable 1	Variable 2
Media	0,268	0,168
Varianza	0,01920632	0,03208
Observaciones	20	20
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,19630184	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	19	
Estadístico t	1,81024641	
P(T<=t) una cola	0,04305155	
Valor crítico de t (una cola)	1,72913133	
P(T<=t) dos colas	0,08610311	
Valor crítico de t (dos colas)	2,0930247	

-Realizando un análisis con SPSS de las diferentes combinaciones agrupadas en función de los reguladores:

Medios A, B y C. (0,1. 0,5 y 1mg/l BAP)

Análisis de varianza univariante

Factores inter-sujetos

	N
LUZ 0	30
1	30
Cito(BAP) .10	20
.50	20
1.00	20

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PESO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo	1.005 ^a	6	.167	14.245	.000
LUZ	1.700E-02	1	1.700E-02	1.446	.234
BAP	.313	2	.157	13.328	.000
LUZ * BAP	2.324E-02	2	1.162E-02	.989	.379
Error	.635	54	1.175E-02		
Total	1.639	60			

a. R cuadrado = .613 (R cuadrado corregida = .570)

Significativo nivel de BAP

Medios D v F:

Factores inter-sujetos		
		N
LUZ	0	20
	1	20
Aux (NAA)	.5	20
	1	20

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: A peso

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	427.675 ^a	3	142.558	4.218	.012
Intersección	3900.62	1	3900.625	115.413	.000
LUZ	308.02	1	308.025	9.114	.005
NAA	.625	1	.625	.018	.893
LUZ * NAA	119.02	1	119.025	3.522	.069
Error	1216.70	36	33.797		
Total	5545.00	40			
Total corregida	1644.37	39			

N

a. R cuadrado = .260 (R cuadrado corregida = .198)

Significativo factor luz/oscuridad

Factores inter-sujetos		
		N
LUZ	.0	20
	1.0	20
D	.05	20
	.1	20

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PESO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo	1.192 ^a	4	.298	9.709	.000
LUZ	8.100E-02	1	8.100E-02	2.639	.113
D	5.929E-02	1	5.929E-02	1.932	.173
LUZ * D	5.329E-02	1	5.329E-02	1.736	.046
Error	1.105	36	3.070E-02		
Total	2.297	40			

a. R cuadrado = .519 (R cuadrado corregida = .466)

Significativa interacción: Luz/dosis de 2,4D

-Comparación de medias en el segundo ensayo de multiplicación (test de comparación de muestras suponiendo varianzas desiguales), medios ANA1 (variable 2) y ND1 (variable 1), solo hay significación en oscuridad.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

ND1/ ANA1 oscuridad

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,174	0,275
Varianza	0,01178222	0,01369444
Observaciones	10	10
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	-2,00101374	
P(T<=t) una cola	0,03035151	
Valor crítico de t (una cola)	1,73406306	
P(T<=t) dos colas	0,06070302	
Valor crítico de t (dos colas)	2,10092367	

Significativo el crecimiento de los callos en ANA1 en oscuridad

2. Ensayos de inducción de E2.

-Análisis de la varianza entre los diferentes tratamientos con NPA, columnas de la 1-4 niveles 0,1, 0,5 , 50mM y 0 (control)

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	10	4,01	0,401	0,00641
Columna 2	10	4,35	0,435	0,01793889
Columna 3	10	4,99	0,499	0,01209889
Columna 4	10	2,41	0,241	0,04887667

NPA

significativo en todas las concentraciones

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,36164	3	0,12054667	5,65121367	0,00280235	2,86626545
Dentro de los grupos	0,76792	36	0,02133111			
Total	1,12956	39				

Significativo 5,65>2,86

-Análisis de varianza entre los diferentes tratamientos con CoCl y ácido salicílico. Columnas 1 y 2 CoCl 0,1 y 1µm respectivamente, columnas 3 y 4 ácido salicílico 0,1 y 0,5µm respectivamente y la columna 5 el control sin tratamiento. El resto de concentraciones no se han incluido en el análisis dado que el crecimiento fue 0.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	6	2,78	0,46333333	0,00298667
Columna 2	6	1,56	0,26	0,0046
Columna 3	6	1,66	0,27666667	0,00562667
Columna 4	6	1,06	0,17666667	0,00518667
Columna 5	6	1,64	0,27333333	0,00502667

0.1µm de CoCl
significativo

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,26546667	4	0,06636667	14,1647695	3,6288E-06	2,75871059
Dentro de los grupos	0,11713333	25	0,00468533			
Total	0,3826	29				

Significativo 14,16>2,75

-Análisis de varianza con diferentes tratamientos de PUT y tiosulfato de plata, columnas 1-4, 0,1, 0,5, 5 y 25µm de putrescina respectivamente, columnas 5 y 6, 0,6 y 3µm de tiosulfato de plata y columna 7 control sin tratamiento.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	6	2,13	0,355	0,01143
Columna 2	6	1,28	0,21333333	0,05070667
Columna 3	6	3,78	0,63	0,01096
Columna 4	6	3,12	0,52	0,00604
Columna 5	6	4,4	0,73333333	0,01874667
Columna 6	6	2,29	0,38166667	0,00329667
Columna 7	6	1,64	0,27333333	0,00502667

5 y 25µm de

PUT

significativo

0.6µm tiosulfato de
plata significativo

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,30935714	6	0,21822619	14,383121	3,4135E-08	2,37178455
Dentro de los grupos	0,53103333	35	0,01517238			
Total	1,84039048	41				

Significativo 14,38>2,37

3. Formación y desarrollo de embriones dipolares.

-Prueba t para dos muestras emparejadas entre 1ª y 2ª quincena de tratamiento.

Tratamientos 1 y 2, combinado AJ/sacarosa. Variable 1, 15 días, variable 2, 30 días.

1. Peso

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

peso 15 y 30 tratamiento 1

	Variable 1	Variable 2
Media	0,13	0,19166667
Varianza	0,01434545	0,02545152
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	0,91299482	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-3,04982305	
P(T<=t) una cola	0,0055255	
Valor crítico de t (una cola)	1,79588369	
P(T<=t) dos colas	0,01105099	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20098627	

Significativo incremento en peso en segunda quincena, tratamiento 1.

2. Longitud.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

long 15 y 30 días tratamiento 2

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,91666667	0,51666667
Varianza	0,70878788	0,43969697
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	0,21604004	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	1,45472763	
P(T<=t) una cola	0,08683947	
Valor crítico de t (una cola)	1,79588369	
P(T<=t) dos colas	0,17367894	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20098627	

Significativo incremento en longitud primera quincena, tratamiento 2.

3. Grosor.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

Grosor 15 y 30 días tratamiento 2

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,13333333	0,325
Varianza	0,02969697	0,08022727
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,22349689	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-1,82925558	
P(T<=t) una cola	0,04728696	
Valor crítico de t (una cola)	1,79588369	
P(T<=t) dos colas	0,09457391	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20098627	

Significativo incremento en grosor segunda quincena, tratamiento 2.

5. Análisis de poliaminas.

Niveles de las diferentes poliaminas libres y conjugadas en los cuatro estadios, las columnas representan las cinco diferentes poliaminas analizadas.

Columnas 1-5, DAP, PUT, CAD, SPD y SPM

E1 libres

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	2.71	0.90333333	1.62203333
Columna 2	3	3.17	1.05666667	1.13803333
Columna 3	3	3.08	1.02666667	1.27963333
Columna 4	3	2.57	0.85666667	0.68763333
Columna 5	3	1.61	0.53666667	0.16543333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.51482667	4	0.12870667	0.13152749	0.96724886	3.47804985
Dentro de los grupos	9.78553333	10	0.97855333			
Total	10.30036	14				

No significativas PAs totales

Columnas 1-4, PUT, CAD, SPD y SPM

E2 libres

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	8.32	2.77333333	1.04973333
Columna 2	3	2.04	0.68	0.3493
Columna 3	3	2.46	0.82	0.0931
Columna 4	3	0.83	0.27666667	0.16963333

significativa PUT

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	11.1812917	3	3.72709722	8.97140928	0.00612871	4.06618028
Dentro de los grupos	3.32353333	8	0.41544167			
Total	14.504825	11				

Significativo $8,97 > 4,06$

Columnas 1-5, DAP, PUT, CAD, SPD y SPM.

E1 conjugadas

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	1.06	0.35333333	0.10003333
Columna 2	3	2.65	0.88333333	0.24333333
Columna 3	3	1.95	0.65	0.1729
Columna 4	3	1.16	0.38666667	0.00163333
Columna 5	3	0.06	0.02	0.0012

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.27697333	4	0.31924333	3.0749695	0.06814364	3.47804985
Dentro de los grupos	1.0382	10	0.10382			
Total	2.31517333	14				

E2 conjugadas

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	14.25	4.75	1.6771
Columna 2	3	33.04	11.01333333	6.43323333
Columna 3	3	8.54	2.84666667	0.83573333
Columna 4	3	2.07	0.69	0.0831
Columna 5	3	1.66	0.55333333	0.07693333

significativa PUT significativo DAP

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	221.732493	4	55.4331233	30.437357	1.4159E-05	3.47804985
Dentro de los grupos	18.2122	10	1.82122			
Total	239.944693	14				

Significativo 30,43>3,47

ANEXO IV

DATOS TOTALES.

Datos totales primer ensayo de multiplicación, (Figura 19 A y B)

Medio A

Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
0.11	0.12	0.12	0
0.04	0.04	0.04	0
0.13	0.15	0.17	0
0.1	0.12	0.14	0
0.13	0.14	0.16	0
0.12	0.14	0.14	0
0.15	0.2	0.18	0.18
0.09	0.12	0.11	0.11
0.1	0.12	0.12	0.12
0.08	0.08	0.11	0
0.06	0.09	0.08	0
0.04	0.07	0.06	0
0.17	0.22	0.21	0.2
0.06	0.07	0.08	0.1
0.09	0.1	0	0
0.06	0.06	0	0
0.04	0	0	0
0.06	0.09	0.08	0
0.06	0.08	0.08	0
0.04	0	0	0

Medio B

Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
0.19	0.26	0.32	0.39
0.06	0.12	0.19	0.26
0.15	0.24	0.33	0.43
0.19	0.25	0.31	0.38
0.18	0.34	0.47	0.63
0.06	0.06	0.07	0.08
0.22	0.43	0.66	0.91
0.17	0.21	0.23	0.26
0.18	0.29	0.39	0.5
0.09	0.13	0.13	0.14
0.05	0.07	0.27	0.09
0.16	0.2	0.4	0.21
0.07	0	0	0
0.02	0.05	0.08	0.07
0.08	0.08	0	0
0.06	0.1	0.1	0.1
0.13	0.25	0.37	0.49
0.08	0.1	0.12	0.17
0.12	0.16	0.16	0.16
0.1	0.16	0.22	0.3

Medio C

Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
0.05	0.07	0.07	0.09
0.15	0.21	0.23	0.24
0.12	0.27	0.38	0.55
0.15	0.27	0.36	0.56
0.09	0.14	0.18	0.24
0.05	0.09	0.12	0.18
0.06	0.09	0.12	0.23
0.1	0.17	0.23	0.31
0.05	0.08	0.12	0.33
0.07	0.09	0.12	0.62
0.17	0.31	0.42	0.52
0.12	0.21	0.28	0.3
0.09	0.11	0.15	0.17
0.12	0.14	0.16	0
0.08	0.09	0.12	0
0.09	0.11	0.16	0.15
0.22	0	0	0
0.28	0.38	0.45	0.52
0.17	0.28	0.37	0.49
0.09	0.14	0.19	0.18

Medio D

Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
0.24	0.32	0.39	0.47
0.07	0.12	0.14	0.19
0.15	0.24	0.33	0.49
0.08	0.24	0.27	0.35
0.07	0.15	0.21	0.28
0.05	0.15	0.23	0.3
0.16	0.24	0.34	0.46
0.08	0.2	0.33	0.5
0.06	0.13	0.22	0.31
0.1	0.22	0.4	0.68
0.06	0.16	0.21	0.33
0.07	0.12	0.16	0.21
0.04	0.11	0.17	0.26
0.15	0.24	0.32	0.43
0.24	0.41	0.54	0.75
0.07	0.13	0.18	0.27
0.21	0.23	0.23	0.23
0.11	0.15	0.16	0.16
0.11	0.19	0.29	0.36
0.14	0.26	0.34	0.47

Medio E

Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
0.09	0.19	0.27	0.43
0.02	0.19	0.18	0.34
0.11	0.23	0.28	0.53
0.05	0.14	0.18	0.35
0.16	0.44	0.62	0.98
0.08	0.16	0.18	0.34
0.14	0.22	0.26	0.42
0.09	0.15	0.17	0.28
0.08	0.15	0.19	0.32
0.17	0.37	0.54	0.8
0.09	0	0	0
0.07	0	0	0
0.12	0.21	0.31	0.41
0.09	0.11	0.11	0.12
0.12	0.18	0.21	0.25
0.17	0.35	0.48	0.74
0.15	0.21	0.25	0.3
0.08	0.1	0.1	0
0.06	0.09	0.23	0.3
0.15	0.23	0.27	0.32

Medio F

Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
0.08	0.11	0.15	0.28
0.1	0.18	0.21	0.3
0.14	0.19	0.27	0.42
0.08	0.11	0.17	0.55
0.21	0.33	0.42	0.5
0.13	0.17	0.22	0.24
0.12	0.2	0.39	0.49
0.11	0.15	0.28	0.38
0.08	0.11	0.15	0.22
0.08	0.14	0.22	0.37
0.04	0.06	0.07	0.09
0.11	0.12	0.13	0.16
0.08	0.12	0.15	0.22
0.13	0.17	0.21	0.27
0.26	0.31	0.4	0.48
0.09	0.15	0.21	0.32
0.04	0.06	0.07	0.11
0.1	0.14	0.17	0.2
0.08	0.11	0.13	0.16
0.06	0.08	0.1	0.13

Medio G

Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
0.1	0.15	0.18	0.24
0.13	0.18	0.22	0.25
0.13	0.17	0.21	0.21
0.1	0.13	0.13	0.14
0.08	0.1	0.1	0.1
0.08	0.11	0.12	0.15
0.18	0.18	0.23	0.24
0.31	0.38	0.46	0.45
0.08	0	0	0
0.05	0.07	0.14	0.18
0.17	0.26	0.29	0.27
0.09	0.13	0.17	0.18
0.15	0	0	0
0.12	0	0	0
0.15	0.23	0.29	0.32
0.07	0.1	0.16	0.18
0.1	0	0	0
0.08	0	0	0
0.18	0.31	0.4	0.45
0.03	0.14	0.2	0.2

Medio N

Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
0.19	0.26	0.32	0.39
0.06	0.12	0.19	0.26
0.15	0.24	0.33	0.43
0.19	0.25	0.31	0.38
0.18	0.34	0.47	0.63
0.06	0.06	0.07	0.08
0.22	0.43	0.66	0.91
0.17	0.21	0.23	0.26
0.18	0.29	0.39	0.5
0.09	0.13	0.13	0.14
0.05	0.07	0.27	0.09
0.16	0.2	0.4	0.21
0.07	0	0	0
0.02	0.05	0.08	0.07
0.08	0.08	0	0
0.06	0.1	0.1	0.1
0.13	0.25	0.37	0.49
0.08	0.1	0.12	0.17
0.12	0.16	0.16	0.16
0.1	0.16	0.22	0.3

Los 10 primeros datos de cada columna se corresponden con las medidas en oscuridad y los 10 últimos las medidas en luz.

Medio A		Oscuridad(media)	Desviación típica	Luz(media)	Desviación típica
	Sem 1	0.105	0.031	0.068	0.038
	Sem 2	0.123	0.042	0.078	0.061
	Sem 3	0.129	0.039	0.059	0.065
	Sem 4	0.041	0.068	0.03	0.067
Medio B		Oscuridad(media)	Desviación típica	Luz(media)	Desviación típica
	Sem 1	0.114	0.035	0.112	0.05
	Sem 2	0.178	0.063	0.182	0.066
	Sem 3	0.249	0.088	0.218	0.082
	Sem 4	0.265	0.09	0.263	0.1
Medio C		Oscuridad(media)	Desviación típica	Luz(media)	Desviación típica
	Sem 1	0.089	0.03	0.143	0.066
	Sem 2	0.148	0.078	0.177	0.11
	Sem 3	0.193	0.106	0.223	0.145
	Sem 4	0.335	0.103	0.233	0.1
Medio D		Oscuridad(media)	Desviación típica	Luz(media)	Desviación típica
	Sem 1	0.106	0.059	0.12	0.065
	Sem 2	0.201	0.063	0.2	0.09
	Sem 3	0.286	0.085	0.26	0.11
	Sem 4	0.403	0.13	0.347	0.15
Medio E		Oscuridad(media)	Desviación típica	Luz(media)	Desviación típica
	Sem 1	0.099	0.04	0.11	0.03
	Sem 2	0.224	0.09	0.148	0.1
	Sem 3	0.287	0.12	0.196	0.14
	Sem 4	0.479	0.18	0.244	0.18
Medio F		Oscuridad(media)	Desviación típica	Luz(media)	Desviación típica
	Sem 1	0.113	0.04	0.099	0.065
	Sem 2	0.169	0.06	0.132	0.072
	Sem 3	0.248	0.09	0.164	0.096
	Sem 4	0.375	0.11	0.214	0.11
Medio G		Oscuridad(media)	Desviación típica	Luz(media)	Desviación típica
	Sem 1	0.124	0.07	0.114	0.048
	Sem 2	0.147	0.099	0.117	0.11
	Sem 3	0.179	0.12	0.151	0.14
	Sem 4	0.196	0.11	0.16	0.15
Medio N		Oscuridad(media)	Desviación típica	Luz(media)	Desviación típica
	Sem 1	0.149	0.057	0.087	0.0017
	Sem 2	0.233	0.109	0.117	0.074
	Sem 3	0.31	0.1	0.172	0.14
	Sem 4	0.398	0.15	0.159	0.14

Datos totales segundo ensayo de multiplicación (Figuras 20 y 21)

Po ND1	P14d ND1	P35d ND1	Po NAA	P14d NAA	P35d NAA
0.12	0.17	0.27	0.13	0.15	0
0.11	0.18	0.27	0.22	0.33	0.55
0.14	0.24	0.55	0.1	0.2	0.45
0.1	0.19	0.35	0.12	0.22	0.36
0.05	0.09	0.18	0.09	0.13	0.27
0.09	0.16	0.28	0.12	0.23	0.48
0.14	0.21	0.33	0.18	0.32	0.58
0.08	0.08	0.15	0.13	0.22	0.41
0.1	0.1	0	0.1	0.18	0.36
0.1	0.17	0.29	0.15	0.28	0.5
0.15	0.19	0	0.15	0.21	0.4
0.11	0.14	0.19	0.13	0.17	0.29
0.11	0.18	0.22	0.14	0.24	0.44
0.07	0.12	0.23	0.12	0.16	0.31
0.08	0.11	0.18	0.05	0.08	0.14
0.14	0.19	0.33	0.13	0.22	0.32
0.16	0.23	0.33	0.12	0.18	0.33
0.16	0.25	0.41	0.11	0.13	0
0.12	0.18	0.27	0.09	0.09	0
0.21	0.3	0.5	0.11	0.13	0.16

Los diez primeros datos de cada columna corresponden a las medidas en oscuridad y los diez restantes a las medidas en luz.

Datos totales del primer ensayo de inducción: ensayo BAP/TDZ (Figura 23).

Resultados primer ensayo de inducción de E2.

Supervivencia e inducción de explantes tratados con BAP*			Supervivencia e inducción de explantes tratados con TDZ*		
Medio	Supervivencia	Polaridad Inducida	Medio	Supervivencia	Polaridad inducida
1	6	1	1	5	3
2	2	-	2	3	-
3	5	-	3	4	-
4	10	-	4	4	1
5	10	-	5	6	-
6	10	-	6	7	-
7	10	-	7	8	-
8	10	-	8	6	-
9	10	-	9	9	2
10	10	-	10	10	-
11	10	-	11	7	-
12	10	4	12	8	-
13	10	-	13	9	3
14	10	-	14	10	1
15	10	-	15	10	3
16	1	-	16	10	-
17	1	-	17	10	3
18	8	-	18	10	6
19	5	-	19	10	4
20	5	-	20	7	1+1**
21	10	-	21	4	3
22	9	-	22	4	-
23	10	-	23	7	4
24	10	6	24	5	-
25	10	2	25	9	1
26	7	1	26	8	-
27	10	-	27	10	2
28	4	-	28	10	2
29	8	-	29	10	-
30	2	-	30	7	-
31	-	-	31	9	-
32	-	-	32	6	1
33	-	-	33	-	-
34	-	-	34	9	-
35	2	-	35	3	-
36	1	-	36	1	-
			37	1	-
			38	3	2
			39	8	1
			40	4	1
			41	3	-
			42	5	1
			43	4	-
			44	5	-
			45	8	1

Eliminado: ¶
Tabla 2.5

Eliminado: y

Eliminado: brotación

Eliminado: y brotación

Eliminado: los

Eliminado: los

* La respuesta se mide en numero de explantes de los 10 empleados en cada ensayo.

** En el medio 20 con TDZ apareció un corno

Datos totales segundo ensayo de inducción : efecto del AJ (Figura 25)

Semana 4

Medio	Explante	ANA	BAP	AJ	superviv	polaridad
1	1	0,2	4	0	1	2
	2	0,2	4	0	1	3
	3	0,2	4	0	1	3
	4	0,2	4	0	1	3
	5	0,2	4	0	1	3
	6	0,2	4	0	0	0
	7	0,2	4	0	1	3
	8	0,2	4	0	1	3
2	1	0,2	4	0,1	1	0
	2	0,2	4	0,1	1	0
	3	0,2	4	0,1	1	1
	4	0,2	4	0,1	1	1
	5	0,2	4	0,1	1	2
	6	0,2	4	0,1	1	1
	7	0,2	4	0,1	1	1
	8	0,2	4	0,1	1	1
3	1	0,2	4	0,5	1	2
	2	0,2	4	0,5	1	2
	3	0,2	4	0,5	1	1
	4	0,2	4	0,5	1	1
	5	0,2	4	0,5	1	2
	6	0,2	4	0,5	1	1
	7	0,2	4	0,5	1	3
	8	0,2	4	0,5	1	2
4	1	0,2	6	0	1	3
	2	0,2	6	0	1	4
	3	0,2	6	0	1	2
	4	0,2	6	0	1	2
	5	0,2	6	0	1	5
	6	0,2	6	0	1	4
	7	0,2	6	0	1	1
	8	0,2	6	0	1	2
5	1	0,2	6	0,1	1	4
	2	0,2	6	0,1	1	3
	3	0,2	6	0,1	1	4
	4	0,2	6	0,1	1	3
	5	0,2	6	0,1	1	0
	6	0,2	6	0,1	1	0
	7	0,2	6	0,1	1	4
	8	0,2	6	0,1	1	3

Tabla con formato

<u>6</u>	<u>1</u>	<u>0.2</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>3</u>
	<u>2</u>	<u>0.2</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.2</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>4</u>	<u>0.2</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>5</u>	<u>0.2</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>6</u>	<u>0.2</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.2</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>8</u>	<u>0.2</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
<u>7</u>	<u>1</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>2</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>5</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>7</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>8</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
<u>8</u>	<u>1</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>2</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>3</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>5</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>3</u>
	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>8</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
<u>9</u>	<u>1</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>2</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>3</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>5</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>7</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>8</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
<u>10</u>	<u>1</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>3</u>
	<u>2</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>4</u>
	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>7</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>8</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1</u>

← Tabla con formato

<u>11</u>	<u>1</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>8</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>12</u>	<u>1</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>
	<u>2</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>3</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>5</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>8</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
<u>Semana 8</u>						
Medio	Explant	ANA	BAP	AJ	E2	E2-E3
<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>4</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>6</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>2</u>	<u>1</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>4</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>6</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>3</u>	<u>1</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>2</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>4</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>6</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>8</u>	<u>0.2</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>0</u>

Tabla con formato

Con formato: Sangría:
Primera línea: 0 cm

Tabla con formato

Con formato: Fuente: Negrita

Con formato: Sangría:
Primera línea: 0 cm

<u>4</u>	<u>1</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>1</u>
	<u>3</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>4</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>1</u>
	<u>6</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
<u>5</u>	<u>1</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>3</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>4</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>6</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>6</u>	<u>1</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>4</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>6</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0,2</u>	<u>6</u>	<u>0,5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>7</u>	<u>1</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>4</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>6</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>8</u>	<u>1</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0,1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0,1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0,1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>4</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0,1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0,1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>6</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0,1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0,1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0,5</u>	<u>4</u>	<u>0,1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>

Tabla con formato

<u>9</u>	<u>1</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0.5</u>	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>10</u>	<u>1</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>11</u>	<u>1</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
<u>12</u>	<u>1</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>1</u>	<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>3</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>4</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>7</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	<u>8</u>	<u>0.5</u>	<u>6</u>	<u>0.5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>

← Tabla con formato

Datos totales segundo ensayo de inducción de polaridad: otros compuestos

Resultados ensayo con AVG, BICP, TIBA y NPA (Figura 27).

AVG 0,1 micromolar			AVG 0,5 micromolar		
Explante	Ap	polaridad	Explante	Ap	Polaridad
1	0,11	0	1	0,24	0
2	0,1	0	2	0,31	0
3	0,32	0	3	0,28	0
4	0,23	0	4	0,22	0
5	0,13	0	5	0,23	0
6	0,19	0	6	0,15	0
AVG 5 micromolar			AVG 50 micromolar		
Explante	Ap	polaridad	Explante	Ap	polaridad
1	0,28	0	1	0,34	0
2	0,25	0	2	0,33	0
3	0,26	0	3	0,03	0
4	0,39	0	4	0,53	0
5	0,3	0	5	0,1	0
6	0,42	0	6	0,22	0
BITC 0,1 micromolar			BITC 0,5 micromolar		
Explante	Ap	polaridad	Explante	Ap	Polaridad
1	0,24	0	1	0,29	0
2	0,23	0	2	0,25	0
3	0,23	0	3	0,31	0
4	0,27	0	4	0,34	0
5	0,24	0	5	0,43	12
6	0,21	0	6	0,45	0
BITC 5 micromolar			BITC 50 micromolar		
Explante	Ap	polaridad	Explante	Ap	Polaridad
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0
6	0	0	6	0	0

TIBA 0,1 micromolar

Explante	Ap	polaridad
1	0,39	0
2	0,29	0
3	0,17	0
4	0,55	3
5	0,19	0
6	0,03	0

TIBA 0,5 micromolar

Explante	Ap	polaridad
1	0,27	0
2	0,43	0
3	0,27	0
4	0,15	0
5	0,35	0
6	0,19	0

TIBA 50 micromolar

Explante	Ap	polaridad
1	0,26	0
2	0,15	0
3	0,2	0
4	0,22	0
5	0,19	0
6	0,29	0

NPA 0,1 micromolar

Explante	Ap	polaridad
1	0,43	0
2	0,47	0
3	0,5	0
4	0,42	0
5	0,5	0
6	0,41	0

NPA 0,5 micromolar

Explante	Ap	polaridad
1	0,41	0
2	0,62	0
3	0,54	0
4	0,41	0
5	0,58	0
6	0,41	0

NPA 50 micromolar

Explante	Ap	polaridad
1	0,61	0
2	0,48	0
3	0,55	0
4	0,6	0
5	0,55	0
6	0,66	0

Resultados ensayo con Ácido salicílico, CoCl₂, Putrescina y Tiosulfato de plata (Figura 28).

0,1mm ácido salicílico

Explante	Ap	polaridad
1	0,38	3
2	0,23	inic polaridad
3	0,34	0
4	0,22	Sr
5	0,19	Sr
6	0,3	inic polaridad

0,5mm ácido salicílico

Explante	Ap	polaridad
1	0,11	Sr
2	0,28	Sr
3	0,09	Inic polaridad
4	0,16	6
5	0,19	Inic polaridad
6	0,23	Inic polaridad

1mm ácido salicílico

Explante	Ap	polaridad
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

5mm ácido salicílico

Explante	Ap	polaridad
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

CoCl 0,1mm			CoCl 1mm		
Explante	Ap	polaridad	Explante	Ap	polaridad
1		0,42 Sr	1		0,2 Sr
2		0,45 inic polaridad	2		0,27 inic polaridad
3		0,5 Sr	3		0,38 inic polaridad
4		0,55	4		0,28 3
5		0,46	5		0,2 inic polaridad
6		0,4 inic polaridad	6		0,23 Sr
CoCl 10mm			CoCl 100mm		
Explante			Explante		
1		0	1		0
2		0	2		0
3		0	3		0
4		0	4		0
5		0	5		0
6		0	6		0
PUT 0,1mm			Put 0,5mm		
Explante	Ap	polaridad	Explante	Ap	Polaridad
1		0,28 inic polaridad	1		0,22 inic polaridad
2		0,49 nod grandes	2		0,19 Sr
3		0,37 nod grandes	3		0 M
4		0,47 inic polaridad	4		0,17 inic polaridad
5		0,29 Sr	5		0,06 inic polaridad
6		0,23 Sr	6		0,64 inic polaridad
PUT 5mm			PUT 25mm		
Explante	Ap	polaridad	Explante	Ap	polaridad
1		0,51 inic polaridad	1		0,56 1
2		0,64 inic polaridad	2		0,5 Sr
3		0,64 inic polaridad	3		0,44 Sr
4		0,82 inic polaridad	4		0,52 2
5		0,58 3	5		0,45 Sr
6		0,59 inic polaridad	6		0,65 2
Tios 0,2mm			Tios 1mm		
Explante	Ap	B	Explante	Ap	polaridad
1		0,68 inic polaridad	1		0,42 Sr
2		0,6 inic polaridad	2		0,29 1
3		0,69 Sr	3		0,41 inic polaridad
4		0,77 Sr	4		0,37 inic polaridad
5		0,99 inic polaridad	5		0,45 inic polaridad
6		0,67 Sr	6		0,35 inic polaridad
Tios 5mm			Tios 25mm		
Explante	Ap	polaridad	Explante	Ap	polaridad
1		0	1		0
2		0	2		0
3		0	3		0
4		0	4		0
5		0	5		0
6		0	6		0

Ensayo del efecto del ácido jasmónico en la formación de cormos.

Primer ensayo. (Figura 29A)

-Material en fase de brotación, medio ½ MS, 50g/l sacarosa, 100mg/l Abscóbico, 5.6g/l agar y 1 mg/l BAP, 25 tubos por ensayo:

	Crecimiento normal	Muy Desarrollados
0) Control con 0 mg/l Jas	22	3
1) 0.3 mg/l Jas	14	11
2) 0.5 mg/l Jas*	10	15
3) 1 mg/l Jas*	13	12

	Formación de cormos	Crecimiento lento de los embriones
C	12	88
Medio 1	44	56
Medio 2	60	40
Medio 3	48	52

Segundo ensayo. (Figura 29B)

Medio C			Medio 2		
Ap	A nº embriones dipolares	A long polo apical	Ap	A nº embriones dipolares	A long polo apical
0,09	0	0,4	0,04	0	0,5
0,09	1	0	0,09	0	0,2
0,04	2	0	0,12	0	0,4 0,4 1,1
0,04	0	0,3	0,02	0	0,5
0,02	1 1 0,8		0,11	0	1
0,03	0	0,2	0,05	0	0,6
0,01	1	1	0,08	0	1
0,09	0 1 1		0,06	0	1
0,09	0	0,5	0,02	0	1,5
0,06	0	0,5 0,5	0,08	0	1
Medio 3					
Ap	A nº embriones dipolares	A long polo apical			
0,11	0	2			
0,14	1	0,7			
0,12	3	0,2			
0,05	0	0,8			
0,1	0	1,2 0,7			
0,03	2	0,3			
0,17	1	0,5			
0,04	2	0			
0,1	0	3			
0,03	0	0,8			

Ensayo de maduración. (Figura 31A)

		15 días	30 días
a)	Inicio de desarrollo de cormo en la base	6	4
b)	Cormo pequeño sin brote	0	0
c)	Cormo pequeño con brote	12	12
d)	Cormo grueso	3	0
e)	Cormo grueso con brote	0	3
f)	Sin respuesta	4	6

	a	B	c	d	E	f	
15 días		25	0	50	8,33	0	16,6
30 días		16,6	0	50	0	8,33	25

Ensayo en función del grado de desarrollo del explante, FI, FF. (Figura 31B)

Respuesta		Sin respuesta	Raíces	Desarrollo brotes	Cormo
Control	FI	9	2	4	-
	FF	9	-	3	3
1	FI	11	-	4	-
	FF	4	5	3	2

		Cormos	Crec brotes	Raíces	Sin respuesta
Control	FI	0	26,6	13,3	60
	FF	21,43	21,43	0	57,14
Tratamiento	FI	0	26,6	0	73,3
	FF	14,28	21,43	35,71	28,57

Tratamiento combinado AJ/Sacarosa.

Primeros 15 y 30 días de tratamiento, tratamientos 1 y 2. (Figura 33 A y B)

Tratamiento 1

	a	B	c	d	E	
15 días		10	7	1	2	0
30 días		5	7	4	2	2

Tratamiento 2

	a	B	C	d	E	
15 días		10	2	3	3	0
30 días		5	3	8	3	1

Tratamiento 1

	a	B	C	d	E	
15 días		50	35	5	10	0
30 días		28,57	33,33	19	9,52	9,52

Tratamiento 2

	a	b	C	d	E	
15 días		50	10	20	20	0
30 días		25	20	30	20	5

Segundo mes de tratamiento, tratamientos 1 y 2. (Figura 34 A y B)

Tratamiento 1													
Po	P2	Ap1	P4	Ap2	Apt	L 0	L 2	A L1	L 4	A L 2	A L t		
1	0,47	0,66	0,19	1,03	0,37	0,56	1	2,3	2,8	0,5	2,8	0	0,5
2	0,81	1,03	0,22	1,5	0,47	0,69	2	0,5	0,6	0,1	1	0,4	0,5
3	0,16	1,77	1,61	2,53	0,76	2,37	3	3,5	5,5	2	6	0,5	2,5
4	0,2	0,36	0,16	0	0	nr	4	0,3	1	0,7	0	0	0,7
5	0,2	0,29	0,09	0,36	0,07	0,16	5	2	2	0	2,5	0,5	0,5
6	0,4	0,66	0,26	0	0	nr	6	0	0	0	0	0	0
7	0,15	0,25	0,1	0,47	0,22	0,32	7	3,5	3,5	0	4	0,5	0,5
8	0,15	0,22	0,07	0,24	0,02	0,09	8	1,5	2,5	1	3,6	1,1	2,1
9	0,18	0,24	0,06	0,32	0,08	0,14	9	1	3	2	2	0	2
10	0,15	0,23	0,08	0,45	0,22	0,3	10	0	0	0	0,8	0,8	0,8
11	0,22	0,36	0,14	0,49	0,13	0,27	11	1	1,7	0,7	3	1,3	2
12	0,06	0,09	0,03	0,16	0,07	0,1	12	0,5	2,5	2	2,5	0	2
13	0,07	0,11	0,04	0,21	0,1	0,14	13	0,6	1,4	0,8	1	0	0,8
14	0,1	0,17	0,07	0,29	0,12	0,19	14	0,4	1,4	1	1	0	1
15	0,31	0,77	0,46	1,33	0,56	1,02	15	3	5,5	2,5	7,5	2	4,5
16	0,13	0,21	0,08	0	0	nr	16	1	1	0	0	0	0
17	0,49	0,72	0,23	1,06	0,34	0,57	17	3	3,5	0,5	3	0	0,5
18	0,27	0,58	0,31	0,84	0,26	0,57	18	2	2	0	2	0	0
19	0,09	0,15	0,06	0	0	0	19	0	0,3	0,3	0	0	0,3
20	0,19	0,26	0,07	0,39	0,13	0,2	20	0,5	1,5	1	1,5	0	1

Grosor 0	Grosor 2	A gros 1	Grosor 4	A gros 2	A gros t
0,8	1	0,2	1	1,2	0,2
0,3	0,5	0,2	2	0,8	0,3
0,5	0,8	0,3	3	1,2	0,4
0,3	0,5	0,2	4	0	0
0,4	0,4	0	5	0,6	0,2
1	0	0	6	0	0
0,2	0,3	0,1	7	0,5	0,2
0,4	0,4	0	8	0,5	0,1
0,5	0,7	0,2	9	1	0,3
0,5	0,5	0	10	0,9	0,4
1	1	0	11	1,5	0,5
0,2	0,4	0,2	12	1	0,6
0,5	1	0,5	13	1	0
0,2	0,6	0,4	14	1	0,4
0,5	0,5	0	15	0,5	0
0,5	0,5	0	16	0	0
1	1	0	17	2	1
0,3	0,5	0,2	18	0,8	0,3
0,5	0,5	0	19	0	0
0,5	1	0,5	20	0,5	0

Tratamiento 2

Attachments 2													
Po	P2	Ap1		P4	Ap2	Apt	L 0	L 2	A L1	L 4		A L2	A L t
1,19	1,71	0,52	1	2	0,29	0,81	1,5	3,5	2	1	3,5	0	2
0,46	0,53	0,07	2	0,63	0,1	0,17	1,5	2	0,5	2	2,5	0,5	1
0,16	0,26	0,1	3	0,53	0,27	0,37	2,8	4	1,2	3	5	1	2,2
0,35	0,45	0,1	4	0,64	0,19	0,29	2	2,8	0,8	4	4	1,2	4,8
0,55	0,84	0,29	5	1,2	0,36	0,65	2	2,5	0,5	5	2,5	0	0,5
0,83	1,48	0,65	6	2,08	0,6	1,25	2	3	1	6	4	1	2
0,21	0,22	0,01	7	0	0	0,01	1,5	1,5	0	7	0	0	0
0,06	0,08	0,02	8	0	0	0,02	0,2	0,4	0,2	8	0	0	0,2
0,1	0,18	0,08	9	0	0	0,08	0,2	0,3	0,1	9	0	0	0,1
0,15	0,24	0,09	10	0	0	0,09	0,2	0,5	0,3	10	0	0	0,3
0,18	0,22	0,04	11	0,26	0,04	0,08	0,6	1	0,4	11	1	0	0,4
0,17	c	c	12	0	0	0	0,5	c	c	12	0	0	c
0,36	0,51	0,15	13	0,65	0,14	0,29	0,5	1	0,5	13	1	0	0,5
0,26	0,38	0,12	14	0,6	0,22	0,34	1	2,3	1,3	14	3	0,7	2
0,32	0,43	0,11	15	0	0	0,11	0	0	0	15	0	0	0
0,13	0,22	0,09	16	0	0	0,09	0,5	1	0,5	16	0	0	0,5
0,17	0,28	0,11	17	0,54	0,26	0,37	0,5	3	2,5	17	1,5	0	2,5
0,04	0,07	0,03	18	0,1	0,03	0,06	0,1	0,4	0,3	18	0,6	0,2	0,5
0,15	0,2	0,05	19	0,23	0,03	0,08	2	2,4	0,4	19	2	0	0,4
0,13	0,17	0,04	20	0	0	0,04	1	1	0	20	0	0	0

Grosor 0	Grosor 2	A gros 1	Grosor 4	A gros 2	A gros tot
0,5	0,5	0	1	0,7	0,2
0,7	0,9	0,2	2	1	0,3
0,4	0,5	0,1	3	0,6	0,2
0,4	0,5	0,1	4	0,7	0,3
0,6	0,7	0,1	5	0,8	0,2
0,7	2	1,3	6	1	1,3
0,5	0,5	0	7	0	0
0,2	0,2	0	8	0	0
0,2	0,4	0,2	9	0	0,2
0,2	0,5	0,3	10	0	0,3
0,2	0,4	0,2	11	0,3	0,2
0,3	c	c	12	0	0
0,3	0,5	0,2	13	1	0,5
0,3	1	0,7	14	0,8	0
0,5	1	0,5	15	0	15
0,3	0,5	0,2	16	0	0
0,4	0,5	0,1	17	0,3	0
0,1	0,9	0,8	18	0,2	0
0,5	0,5	0	19	0,5	0
0,2	0,2	0	20	0	0

Último ensayo con AJ en medio sólido, respuesta en función del medio de procedencia. (Figura 36)

M4 con AJ						M3					
			sin AJ			con jas			sin jas		
Ap	Ab	Al	Ap	Ab	Al	Ap	Ab	Al	Ap	Ab	Al
0,65	0	0	0,19	1	0	0,68	0	1	0,3	0	1
1,05	0	0,5	0,33	11	8,5	0,54	1	0	0,19	3	0
0,28	8	0,3	0	9	2,5	0,24	1	0	0,46	3	1,5
0,54	3	2,5	0,31	3	2,1	0,17	4	1,5	0,06	0	0,5
0,06	0	1,7	0,3	2	2	0,47	3	0,1	0,38	2	2
0,16	2	0,2	0,05	1	0,5	0,52	4	1,7	0,05	0	0
						2,62	13	4,3	1,44	8	5

M2 con jas						M1 con jas					
			sin jas			con jas			sin jas		
Ap	Ab	Al	Ap	Ab	Al	Ap	Ab	Al	Ap	Ab	Al
0,05	0	0,5	0,03	1	0,8	0,07	0	0	0,17	0	0,5
0,08	0	0	0,26	3	2	0,25	0	0,5	0,13	0	0
0,03	0	0	0,38	14	14	0,18	3	3	0,28	0	1
0,15	0	1	0,19	0	0	0,27	14	7,5	0,34	3	0,7
0,3	0	0	0,35	2	0,5	0,06	2	0,6	0,64	9	6
0,28	1	0,2	0,13	1	0,3	0,09	1	0,3	0,3	0	0,4
0,89	1	1,7	1,34	21	17,6	0,92	20	11,9	1,86	12	8,6

Efectos del GA3 en la maduración del cormo. (Figura 37 A y B)

Primer ensayo. Figura 37A

	Luz (0/1)	Explant	Inicio		Semana 2		Semana 4		fin
			Peso	Grosor	Peso	Grosor	Peso	Grosor	
C	0	1	0.35*	0.8	0.57	1	0.69	1.2	Cormo mediano
		2	0.23	0.3	0.05	0.5	m	m	m
		2-3	0.36	0.5/0.3/0.3	0.52,4mc	0.5/0.3/0.2	0.18bis	0.5/0.5	2 mc de los 4
C1	0	3	0.11	0.3	0.22*	0.5	0.27	0.5	Cormo +raíz
		4	0.07	0.4 mc	0.09	0.5	0.09	0.5	mc
		1	0.07*	0.4	0.16	0.5	0.18	0.5	mc
C2	0	2	0.31	0.7	0.47	0.5	0.58	1	Cormo mediano
		1	0.17*	1.1	0.34	0.3/0.3	0.44	0.5	mc+
		3							movilización del polo apical
C3	0	4	0.03	0.3 mc	0.08	0.4	0.09	0.5	mc
		1	0.18*	0.6	0.18	0.5	0.28	0.5	No cormo
		2	0.21	0.5	0.34	0.7	0.39	0.5	No cormo
C4	0	3	0.12	0.4	0.26	0.7	0.3	0.8	mc
		4	0.5	1	0.44	0.7	0.61	1.3	Cormo mediano
		1	0.15*	0.4	0.24*	0.5	0.28	0.6	mc
C5	0	2	0.15	0.5 mc	0.17	0.6	0.17	0.6	mc
		3	0.06	0.2	0.1	0.2/0.2	0.11	0.4	No cormo
		4	0.17	0.5	0.3	0.5	0.36	0.5	No cormo
C6	0	1	0.06	0.3	0.11	0.3	0.15	0.4	mc
		2	1	0.9	0.98	1.5	1.18	1.5	Cormo mediano
		3	0.07*	0.5	M	m	m	m	m
C7	0	4	0.17	0.5	M	m	m	m	m

* explante con callo en la base

mc microcormo

En los casos en los que hay una disminución de peso es porque se han limpiado los explantes de tejido muerto, porque estaban oxidados.

En lo "no cormo" lo que hay es un desarrollo del engrosamiento en la base y desarrollo del polo apical pero no llega a formar estructura de cormo, no están desarrollados completamente.

	Cormos	
	Microcormos	medianos
C	50	50
C1	75	25
C2	25	25
C3	50	0
C4	25	25

Respuesta (luz)		
medios	50 g/l sacarosa	40 g/l sacarosa
C	Corno	Corno
	Corno	Corno
C1	-	mc muerto
	-	mc
C2	-	mc muerto
	Corno con callo en la base	Corno mediano
C3	Corno con callo en la base	mc con callo en la base
C4	Corno con callo en la base	mc con callo en la base
	Corno muy engrosado con crec anormal	Corno con callo en la base
	Corno muy engrosado con crec anormal	Corno

Medios para la optimización de la proliferación en sistemas de inmersión temporal. Figura 39.

	1	2	3	4	5	6	Oxidación					
Rep1	6.2	4.19	2.82	15.8	20.85	9.42	20	5	80	35	5	75
Rep 2	5.4	5.95	1.32	17.6	22.75	11.18						

Ap		% oxidación	
5,8500	0,8000	20,0000	0,0000
5,0200	0,8800	5,0000	0,0000
2,0700	0,7500	80,0000	0,0000
16,7000	0,9000	35,0000	0,0000
21,8000	0,9500	5,0000	0,0000
10,3000	0,8800	75,0000	0,0000

Efecto de diferentes niveles de PAC. Figura 40

Nivel PAC	0	0,5	1	2	5
A peso	7,6	6	23,7	15,4	12
% HH	60	45	10	0	0

Generación de material nodular. Figura 41

Medio	Pesos		A peso	Aspecto
	Po	Pf		
1. MS	8g	25.6g	17.6g	Algo endurecido
2. MS	8g	31.4g	23.4g	Nodulos muy pequeños
3. MS	8g	24.5g	16.5	Nodulos mas grandes

Inducción de embriones bipolares. Figura 43

Medio	1	2	3
Ap	9,1 / 10,1	4,9 / 5,9	3,9 / 4,9
% desarrollo polo apical	20	35	10
% diferenciación	0	20	15

Ensayo con diferentes fuentes de carbono. Figura 44.

	Glucosa 2%	Glucosa 4%	Sorbitol 2%	Sorbitol 4%	Galactosa 4%	Sacarosa 2%	Sacarosa 3%
Incremento en peso fresco (gr)	4,23	2,14	3,73	13,12	1	5,67	19,22
% Desarrollo del polo apical	0	0	10	0	0	40	0

Resultados obtenidos en las diferentes actividades enzimáticas analizadas.

Figuras 53, 54, 55, 56 y 57

	PHMB-sensible APX		PHM-insensible APX	SOD		
E1	1295.5	40,7	51.6	2,5	16.56	1,1
E2	1487.9	48,3	102.8	8,5	29.29	0,1
E3	1615.8	15,2	49.23	9,28	17.63	0,22
E4	1709.4	28,4	39.4	4,9	11.54	2,61
	CAT		MDHAR	DHAR		
E1	60.12	0,71	296.61	19,2	29.99	1,22
E2	49.23	1,32	285.3	7,2	30.88	0,4
E3	173.14	1,67	288.17	5,75	56.48	2,13
E4	100.16	1,81	323.2	16	21.94	2.35
	Lipid Perox.		GR			
E1	0.374	0,021	159.9	26,35		
E2	0.378	0,012	139.4	1,5		
E3	0.429	0,005	144.9	3,7		
E4	0.644	0,004	152.7	1,53		
	Mn-SOD		Cu-SOD			
E1		27,51	72,49	7,13		7,13
E2		28,3	71,7	3,5		3,51
E3		34,93	65,07	1,84		1,8
E4		46,96	53,04	1,67		1,6

Datos totales de poliaminas. Figuras 58, 59, 60 y 61.

VALORES PARA LAS TRES REPLICAS MICROMOLES POR GRAMO DE PESO FRESCO.

<i>Poliaminas</i>		<i>DAP</i>		<i>PUT</i>		<i>CAD</i>		<i>SPD</i>		<i>SPM</i>	
Estadio		L	C	L	C	L	C	L	C	L	C
E1 N	R1	0	0	5.60	7.048	0.54	0	0.35	0.6303	0	0
	R2	0	0.347	1.06	1.27	0.176	0	0.107	0.2464	0	0
	R3	0	0.665	5.30	7.413	0.31	0	0.43	0.4703	0	0
E1 NAA	R1	2.36	0.61	2.28	0.65	2.33	0.57	1.76	0.41	0.86	0.06
	R2	0	0	0.57	0.55	0.3	0.28	0.68	0.34	0.67	0
	R3	0.35	0.45	0.32	1.45	0.45	1.1	0.13	0.41	0.08	0
E2 E3	R1	0	3.29	2.36	8.13	0	2.26	1.17	0.64	0.75	0.48
	R2	0	5.2	2.02	12.01	0.97	2.38	0.61	0.43	0	0.86
	R3	0	5.76	3.94	12.9	1.07	3.90	0.68	1	0.08	0.32
	R1	0	3.86	2.25	2.86	0.4	0.98	1.02	0.56	0.43	0
	R2	0	0	3.46	5.61	0.55	0.37	0.66	0.78	0	0.24
	R3	0	3.069	2.81	2.56	0.92	0.94	0.56	0.47	0	0.022
E4	0J	R1	0	0	0.103	0	0	0	0	0	0
		R2	0	0	0.223	0.41	0	0.46	0.016	0	1.93
		R3	0	0	0	0	0.61	0	0	0	0
	0.5J	R1	0	0	0.96	1.27	0	0	0.76	0	0.73
		R2	0	0.28	0.78	0.91	0	0	0	0	0
		R3	0	0.48	1.85	3.30	0.18	3.54	0	1.27	0
	1J	R1	0	0.46	1.58	1.94	0	1.94	0	0	0
		R2	0	0.48	0.75	1.30	0.2	1.25	0.1	0.13	0
		R3	0	0.15	0.15	0.31	0	1.08	0	0.21	0
Cormo	R1	0	0.125	0.08	0.211	0	0.354	0	0.26	1	0
	R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R3	0	0	0.37	0	0.16	0	0	0	0	0

Transformación por biolística. Figura 63.

Em gus		P bin gus	
12	26	12	28
	25		30
9	18	9	19
	16		17
cormo	17		
EM Gus		Pbin Gus	
Callo 9cm	17,0000	1,0000	18,0000
Callo 12cm	25,5000	0,5000	29,0000
Cormo 12cm	17,0000	0,0000	0,0000

Transformación mediada por agrobacterium. Figura 69.

Porcentaje de tejido transformado

	Sonicados	Infiltrados	Heridas
D.O 0,2	20	35	0
D.O 0,5	59	40	0
D.O 1	10	20	3

Estudio de la resistencia de los callos no transformados a kanamicina. Figuras 70 y 71.

kan	% superviv	Dosis de kanamicina Ap en 4 semanas	0mg/l	25mg/l	50mg/l	75mg/l
0mg/l	100					
25mg/l	100		0,15	0,22	0,15	0,15
50mg/l	100		0,23	0,19	0,26	0,24
75mg/l	100		0,19	0,17	0,16	0,19
100mg/l	30		0,45	0,47	0,22	0,28
150mg/l	21		0,21	0,35	0,25	0,34
200mg/l	0		0,17	0,19	0,24	0,21
			0,12	0,17	0,21	0,26
			0,16	0,36	0,24	0,23
		Media	0,21	0,265	0,216	0,237
		Desviación típica	0,102	0,113	0,04	0,058

Transformación de protoplastos. Fi gura 74 A y B.

Callo (protop/ml)			Cormo (protop/ml)		
0,00001	Media	0,0000133	0,000007	Media	0,000006
	Desviac típica			Desviación típica	
0,000016		0,00000175	0,000005		0,0000005
0,000014			0,000006		
Callo (protop/gr)			Cormo (protop/gr)		
0,000015	Media	0,00002	0,000008	Media	0,00001
	Desviación típica			Desviación típica	
0,000018		0,0000036	0,000009		0,0000015
0,000027			0,000013		
Frecuencia de transformación			Nº de transformantes/ml		
P.B Gus		33			66
P.B GFP		3			6



BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abdullaev, F. I. 1993. Biological effects of saffron. *Biofactors* 4: 83-86.
- Abdullaev, F. I. y De Mejia, E. G. 1997. Antitumor activity of natural substances: lectins and saffron. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 47: 195-202.
- Abe, K., Sugiura, M., Shoyama, Y. y Saito, H. 1998. Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 787: 132-138.
- Adams, L., Benson, E. E., Staines, H. J., Bremmer, D. H., Millan, S. y Dighton, N. 1999. Effects of the lipid peroxidation products 4-hydroxi-2-nonenal and malondialdehyde on the proliferation and morphogenetic development of in vitro plant cells. *J. Plant Physiol.* 155: 376-386.
- Aebi, M. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
- Aharoni, N. y Lieberman, M. 1979. Ethylene as a regulator of senescence in tobacco leaf discs. *Plant Physiol.* 64: 801-804.
- Ahuja, A., Koul, S., Ram, G. y Kaul, B. L. 1993 Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in saffron, *Crocus sativus* L. *Indian J. Exp. Biol.* 32: 135-140.
- Aitken-Christie, J. y Davies, H. E. 1988. Development of a semi-automated micropropagation system. *Acta Hort.* 230: 81-87.
- Aitken-Christie, J., Kozai, T. y Takayama, S. 1995. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. En: Aitken-Christie, J., Kozai, T. y Smit, M. L. (eds.) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp. 1-18.
- Alarcón, J. y Sánchez, A. 1958. El azafrán. Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura. 13-68-H. Madrid.
- Albrecht, C. 1986. Optimisation of tissue culture media. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 35: 196-199.
- Aleith, F. y Richer, G. 1990. Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. *Planta.* 183: 17-24.
- Alfaro Cuesta, R. 2000. Cultivo *in vitro* de *Crocus sativus* L. establecimiento de un protocolo para el cultivo de tejidos de cormo de azafrán. Trabajo fin de carrera para la obtención del título de Ingeniero Técnico Agrícola por la ETSIA de Albacete. Universidad de Castilla La Mancha.
- Alvard, D., Cote, F. y Teisson, C. 1993. Comparison methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 32: 55-60.

- Anderson, J. O. 1976. Embryogenesis in wild carrot cells. *In vitro*. 12, 332 (Abst. 155).
- Apelbaum, A., Burgoon, A. C., Anderson, J. D., Lieberman, N., Ben-A-Rie, R. y Mattoo, A. K. 1981. Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. *Plant Physiol.* 68: 453-456.
- Apostol, P. F. y Heinsteins, P. S. 1989. Low Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defence and signal transduction. *Plant Physiol.* 90: 109-116.
- Aribaud, M.; Kevers, C.; Martin-Tanguy, J. y Gaspar, T. H. 1999. Low activity of amine-oxidases and accumulation of conjugated polyamines in disfavour of organogenic programs in chrysanthemum leaf disc explants. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* 55: 85-94.
- Arrigoni, O., De Gara, L., Tommasi, F. y Liso, L. 1992. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* 99: 235-238.
- Atta-Aly, M., Saltveit, M. y Hobson, G. 1987. Effect of silver ions on ethylene biosynthesis by tomato fruit tissue. *Plant Physiol.* 83: 44-48.
- Aziz, A. y Larher, F. 1995. Changes in polyamine titers associated with the proline response and osmotic adjustment of rape leaf discs submitted to osmotic stress. *Plant Sci.* 112: 175-186.
- Babu, P. y Chawla, H. S. 2000. *In vitro* regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation in gladiolus. *J. Hort. Sci. Biotech.* 75: 400-404.
- Bach, A. 1992. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and meristems of *Freesia hybrida*. *Acta Hort.* 325: 429-435.
- Bach, A., Pawlowska, B. y Pulczynska, K. 1992. Utilization of soluble carbohydrates in shoot and bulb regeneration of *Hyacinthus orientalis* L. *in vitro*. *Acta Hort.* 325: 487-492.
- Backhaus, R. A., Pettit G. R., (III), Huang, D. S., Pettit, G. R., Groszek, G., Odgers, J. C., Ho, J. y Meerow, A. 1992. Biosynthesis of the antineoplastic pancratistatin following tissue culture of *Hymenocarpis littoralis* (Amaryllidaceae). *Acta Hort.* 306: 364-366.
- Bagnoli, F., Capuana, M. y Racch, M. L. 1998. Developmental changes of catalase and superoxide dismutase in zygotic and somatic embryos of horse chesnut. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 909-913.
- Barandiaran, X., Di Prieto, A. y Martín, J. 1998. Biolistic transfer and expression of a uidA reporter gene in different tissues of *Allium sativum* L. *Plant Cell Rep.* 17: 737-741.

- Bastola, D. R. y Minocha, S. C. 1995. Increased putrescine biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA in carrot promotes somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 109: 63-71.
- Bellettre, A., Couillerot, J. P. y Vasseur, J. 1999. Effects of glycerol on somatic embryogenesis in *Cichorium* leaves. *Plant Cell Rep.* 19: 26-31.
- Belmonte, M., Stasolla, C., Loukanina, N., Yeung, E. C. y Torpe, T. A, 2003. Glutathione modulation of purine metabolism in cultured white spruce embryogenic tissue. *Plant Sci.* 165: 1377-1386.
- Benson, E. E. y Roubelais-Angelakis, A. 1992. Fluorescent lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in tissue cultures of *Vitis vinifera* L. *Plant Sci.* 84: 83-90.
- Bergoñon, S., Sodina, C., Bastida, J., Viladomat, F. y Mele, E. 1992. The snake liquid culture as an alternative way to the multiplication of *Narcissus* plants. *Acta Hort.* 325: 447-452.
- Berglund, T. y Ohlsson, A. B. 1995. Defensive and secondary metabolism in plant tissue cultures, with special reference to nicotinamide, glutathione and oxidative stress. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43: 137-145.
- Berlin, J. y Forche, E. 1981. DL- α -difluoromethyloornithine causes enlargement of cultured tobacco cells. *Z. Pflanzenphysiol.* 101: 272-282.
- Bhagwat, B., Vieria, L. E. G. y Erickson, L. R. 1996. Stimulation of in vitro benzyladenine and gibberellic acid. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 46: 1-7.
- Bhaskaran, S. y Smith, R. H. 1990. Regeneration in cereal tissue: a review. *Crop Sci.* 30: 1328-1336.
- Biondi, S., Fornalé, S., Oksman-Caldentey, K. M., Evea, M., Agostani, S. y Bagni, N. 2000. Jasmonates induce over-accumulation of methyl putrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. *Plant Cell Rep.* 19: 691-697.
- Biondi, S., Scaramagli, S., Capitani, F., Altamura, M. M. y Torrigiani, P. 2001. Methyl jasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot in tobacco thin layers. *J. Exp. Bot.* 355: 231-242.
- Birch, R. G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 297-326.
- Blanc, G., Michaux-Ferrière, N., Teisson, C., Lardet, L. y Carron, M. P. 2000. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 59: 103-112.
- Borkird, C., Choi, J. H. y Sung, Z. R. 1986. Effect of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot. *Plant Physiol.* 81: 1143-1146.

Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. y Martin-Tanguy J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140: 103-125.

Boutilier, K., Offringa, R., Fukuola, H., Sharma, V., Kieft, H., Van Lammeren, A. M., Ouellett, T. y van Lookeren, C. 2000. Ectopic expression of the *Brassica napus baby boom* gene triggers a homeotic conversion of vegetative tissues into embryos and cotyledons (Abstract). *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: s11-s14.

Boxus P. y Quoirin M. 1974. La culture de méristèmes apicaux de quelques espèes de *Prunus*. *Bulletin de la Société Royale Botanique de la Belgique.* 107: 91-101.

Bozhkov, P., Filonova, L. y von Arnold, S. 1998. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiol. Plant.* 104: 211-224.

Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brants, D. H. 1968. A revised medium for *Freesia* meristems culture. *Neth. J. Plant. Path.* 74: 120-121.

Brighton, C. A. 1977. Cytology of *Crocus sativus* and its allies (*Iridaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 128: 137-157.

Broome, O. C. y Zimmerman, R. H. 1984. Culture of shoot meristems: fruit plants. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. En: Vasil, I. K. (ed.) Academic Press, New York, pp:111-129.

Buiteveld, J., Fransz, P. F. y Creemers-Molenaar, J. 1994. Induction and characterization of embryogenic callus types for the initiation of suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.). *Plant Sci.* 100: 195-202.

Burdon, R. H. 1995. Oxidative stress in cultured animal cell. En: Spier, R. E., Griffiths, J. B. (eds.), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 6, Academic Press, New York, pp 129-160.

Burguer, D. W. y Hackett, W. P. 1986. Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyls and root sections of *Citrus*. *Plant Sci.* 43: 229-232.

Burtin, D., Martin-Tanguy, J., Paynot, M. y Rossin, N. 1989. Effects of the suicide inhibitors of arginine and ornithine decarboxylase activities on organogenesis, growth, free polyamine and Hydroxycinnamoyl putrescine levels in leaf explants of *Nicotiana Xanthi* n.c. cultivated *in vitro* on a medium producing callus formation. *Plant Physiol.* 89: 104-110.

Cabasson, C., Alvard, D., Dambier, D., Ollitrault, P. y Teisson, C. 1997. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 50: 33-37.

Cabasson, C., Ollitrault, P., Cote, F. X., Michaux-Ferrière, N., Dambier, D., Dalnic, R. y Teisson, C. 1995. Characteristics of *Citrus* cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. *Physiol. Plant.* 93: 464-470.

Cardoza, V. y Stewart, C. 2003. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. *Plant Cell Rep.* 21: 599-604.

Casoria, P., Laneri, U. y Di Novella, N. 1996. A preliminary note on an interesting species of crocus (*Crocus longiflorus*, Iridaceae) similar to saffron (*Crocus sativus*). *Economic Bot.* 50: 463-468.

Carré, M., Martin-Tanguy, J., Mussillon P. y Martin C. 1978. La culture de méristèmes et la multiplication végétative *in vitro* au service de la pépinière (Tesis), pp:1-65.

Chaleff, R. S. y Stolarz, A. 1981. Factors affecting the frequency of callus formation among cultured rice (*Oriza sativa*) anthers. *Physiol. Plant.* 51: 201-206.

Chang, W. C., Lin, Y. L., Lee, M. J. Shiow, S. J. y Wang, C. J. 1996. Inhibitory effect of crocetin on benzo(a)pyrene genotoxicity and neoplastic transformation in C3H10T1/2 cells. *Anticancer Res.* 16: 3603-3608.

Charrière, F. Hahne, G. 1998. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. *Plant Sci.* 137: 63-71.

Chen, L., Ahang, S., Beachy, R. N., Fauquet, C. M. 1998. A protocol for consistent, large-scale production of fertile transgenic rice plants. *Plant Cell Rep.* 18: 25-31.

Chen, J. y Ziv, M. 2001. The effect of ancymidol on hiperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-cultured *Narcissus*. *Plant Cell Rep.* 20: 22-27.

Chen, S. Y. 1991. Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell. *Plant Physiol. Commun.* 27 (2): 84-90.

Cheng, M., Lowe, B. A., Spencer, T. M., Ye, H. y Armstrong, C. L. 2004. Invited Review: Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 40: 31-45.

Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W. y Wang, Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115: 971-980.

Cheng, M., Hu, T., Layton, J., Liu, C-N. y Fri, J. E. Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 39: 595-604.

- Cheong, J. J. y Choi, Y. D. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet.* 19: 409-413.
- Chi, G. L., Barfield, D. G., Sim, G. E., y Pua, E. C. 1990. Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Rep.* 9: 195-198.
- Chichiricco, G. 1984. Karyotype and meiotic behaviour of the triploid *Crocus sativus* L. *Caryologia.* 37: 233-239.
- Chichiricco, G. 1989. Embryology of *Crocus thomasi* (Iridaceae). *Plant. Syst. Evol.* 168: 39-47.
- Chichiricco, G. 1996. Intra and interspecific reproductive barriers in *Crocus* (Iridaceae). *Plant Syst. Evol.* 201: 83-92.
- Chichiricco, G. 1997. Ultrastructural study of intra and interspecific pollen tube rejection in *Crocus* (Iridaceae). *Caryologia.* 50: 289-301.
- Choi, Y. E., Katsumi, M. y Sano, H. 2001. Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Sci.* 160: 1183-1190.
- Choi, J. H., Liu, L.S., Borkird, C. y Sung, Z. R. 1987. Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 1906-1910.
- Chugh, A. y Khurana, P. 2002. Gene expression during somatic embryogenesis-recent advances. *Curr. Sci.*, 83: 715-730.
- Chrungoo, N. K. y Farooq, S. 1983. Carbohydrate changes in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting. *Trop. Plant Sci. Res.* 1: 295-298.
- Chrungoo, N. K. y Farooq, S. 1984. Influence of gibberelic acid and naphthaleneacetic acid on yield of saffron and on growth in saffron crocus (*Crocus sativus* L.). *Indian J. Plant Physiol.* 27: 201-205.
- Chrungoo, N. K. y Farooq, S. 1985. Correlative changes in carbohydrate content and starch hydrolysing enzymes in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen.* 180: 55-61.
- Claphan, D. 1973. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro*. *Pflanzen-zucht.* 69: 142-155.
- Cohen, S.S. 1998. A Guide to the Polyamines. Oxford: Oxford University Press.
- Cordero de Mesa, M., Jiménez-Bermúdez, S., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. A. y Mercado, J. A. 2000. *Agrobacterium* cells as microprojectile coating: a novel approach to enhance stable transformation rates in strawberry. *J. Plant Physiol.* 27: 1093-1100.

- Creelman, R. A. y Mullet, J. E. 1997a. Oligosacharins, brasinolides and jasmonates: non traditional regulators of plant growth, development and gene expression. *Plant Cell*. 9: 1211-1223.
- Creelman, R. A. y Mullet, J. E. 1997b. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 335-381.
- Dalton, D. A., Langeserg, L., Treneman, N. 1993. Correlations between the ascorbate-glutathione parwa and effectiveness in legume root-nodules. *Physiol. Plant*. 87: 365-370.
- Damm, B. y Willmitzer, L. 1988. Regeneration of fertile plants from protoplasts of different *Arabidopsis thaliana* genotypes. *Mol. General. Genet.* 213: 15-20.
- Danin, M., Upfold, S. J., Levin, N., Nadel, B., Altman, A. y van Staden, J. 1993. Polyamines and cytokinins in celery embryogenic cultures. *Plant Growth Regul.* 12: 245-254.
- Debeljak, M., Regvar, M., Dixon, K. W. y Sivasithamparam, K. 2002. Induction of tuberisation *in vitro* with jasmonic acid and sucrose in an Australian terrestrial orchid, *Pterostylis sanguinea*. *Plant Growth. Regul.* 36: 253-260.
- Deberg, P. C. y Maene, L. J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hort.* 14: 335-345.
- De Gara, L., de Pinto, M. C., Paciolla, C., Cappetti, V. y Arrigoni, O. 1996. Is ascorbate peroxidase only a scavenger of hydrogen peroxide? En: Obinger, C., Burner, U., Pennel, C., Greppin, H. (eds.) *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. University of Geneva, Switzerland, pp 157-162.
- De Gara, L., de Pinto, M. C. y Arrigoni, O. 1997. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiol Plant*. 100: 894-900.
- Deighton, N., Migill, W. J., Bremner, D. H. y Benson, E. E. 1997. Malondialdehyde and 4-hydroxi-2-nonenal in plant tissue cultures: LC-MS determination of 2,4 dinitrophenylhydrazone derivatives. *Free Rad. Res.* 27: 255-257.
- De Jong, A. K., Cordewener, J., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerckhove, J., Van Kammen, a., y De Vries, S. C. 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescue by chitinase. *Plant Cell* 4: 425-433.
- De Meyer, G. Capieau, K. Audenaert, K. Buchala, A. Métraux, J. P. Höfte, M. 1999. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 450-458.
- De Pinto, M. C., Tommasi, F. y De Gara, L. 2000. Enzymes of the biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle of tobacco Bright Yellow 2. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 541-550.

- De Vries, S. C., Booij, H., Janssen, R., Vogels, R., Saris, L., Lo Schiavo, F., Terzi, M., y Van Kammen, A. 1988. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled expression of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes Dev.* 2: 462-476.
- Dhed'a, D., Dumortier-Francoise-Panis, B., Vuylsteke, D. y De Langhe, E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the banana cv. "Bluggoe" (*Musa* ssp. ABB group). *Fruits* 46: 125-135.
- Dix, P. J. y Kavanagh, T.A. 1995. Transforming the plastome: genetic markers and DNA delivery systems. *Euphytica* 85: 29-34.
- Dodeman, V. L., Ducreux, G. y Kreis, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis (review). *J. Exp. Bot.* 313: 1493-1509.
- Dougall, D. K. 1980. Nutrition and metabolism. *Plant Tiss. Cult.* 13: 119-120.
- Druart, P. 1992. *In vitro* culture and micropropagation of plum (*Prunus* spp).. En: Bajaj, Y. P. S. (eds.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin, pp: 279-303.
- Duncan, D. R. y Widholm, J. M. 1987. Improved plant regeneration from maize callus cultures using AgNO₃. *Plant Physiol.* 83. Suppl. 35 (Abst 208).
- Dudits, D., Bogre, L., Bako, L., Dedeoglu, D., Magyar, Z., Kapros, T., Felfodi, F. y Gyorgyey, J. 1993. Key components of cell cycle control during auxin induced cell division. En: Ormrod, J. y Francos, D. (eds.). *Molecular and Cell Biology of the Plant Cell Cycle*. Kluwer Acad. Pub. The Netherlands. pp. 111-131.
- Dunwell, J. M. 1979. Anther culture in *Nicotiana tabacum*: The role of the culture vessel atmosphere in pollen embryo induction and growth. *J. Exp. Bot.* 30: 419-428.
- Eady, C. C., Butler, R. C. y Suo, Y. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo cultures of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Rep.* 18: 111-116.
- Earnshaw, B. A. y Johnsom, M. A. 1987. Control of wild carrot somatic embryo development by antioxidants. *Plant Physiol.* 85: 273-276.
- Enjalric, F., Carron, M. P. y Lardet, L. 1988. Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of *Hevea brasiliensis*. *Acta Hort.* 225: 57-65.
- Escalant, J. V. y Teisson, C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Rep.* 7: 665-668.
- Escalant, J. V., Teisson, C. y Côte, F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30: 181-186.

- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y. y Boroto, C. G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18: 743-748.
- Escribano, J., Alonso, G. L., Coca Prados, M. y Fernández, J. A. 1996. Crocin, safranal and piccrocrocine from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. *Cancer Lett.* 100: 23-30.
- Escribano, J., Rubio, A., Alvarez-Ortí, M., Molina, A. y Fernández, J.A. 2000a. Purification and characterization of a mannan-binding lectin specifically expressed in corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48: 457-463.
- Escribano, J., Rios, I. y Fernández, J.A. 1999a. Isolation and cytotoxic properties of a novel glycoconjugate from corms of saffron (*Crocus sativus* L.). *Biochem. Biophys. Acta.* 1426: 217-222.
- Escribano, J., Díaz- Guerra, M. J., Riese, H. H., Alvarez, A., Proenza, R. y Fernández, J. A. 2000b. The selective cytolytic effect of proteoglycan isolated from corms of saffron plant on human cell lines in culture. *Planta Med.* 66: 157-162.
- Escribano, J., Díaz- Guerra, M. J., Riese, H. H., Ontañón, J., García-Olmo, D. C., Rubio, A. y Fernández, J.A. 1999b. *In vitro* activation of macrophages by a novel proteoglycan isolated from corms of *Crocus sativus* L. *Cancer Lett.* 144: 107-114.
- Escribano, J., Piqueras, A., Medina, J., Rubio, A., Alvarez-Ortí, M. y Fernández J. A. 1999c. Production of cytotoxic proteoglycan using callus culture of saffron corms (*Crocus sativus* L.). *J. Biotechnol.* 73: 53-59.
- Estelle, M. 1998. Polar auxin transport: new support for an old model. *Plant Cell.* 10: 1775-1778.
- Etienne-Barry, D., Bertrand, B., Vasquez, N. y Etienne, H. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Rep.* 199: 111-117.
- Etienne, H. y Berthouly, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 69: 215-231.
- Etienne, H., Lartaud, M., Michaux-Ferrière, N., Cron, M. P., Berthouly, M. y Teisson, C. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea Brasiliensis* (Müll. Arg) using the temporary immersion technique. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 33: 81-87.
- Evans, P. T. y Malmberg, R. L. 1989. Do polyamines have roles in plant development?. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* 40: 235-269.

- Fakhrai, F. y Evans, P. K. 1989. Morphogenic potential of cultured floral explants of *Crocus sativus* L. for the *in vitro* production of saffron. J. Exp. Bot. 222: 47-52.
- Fakhrai, F. y Evans, P. K. 1990. Morphogenic potential of cultured explants of *Crocus corymbosus* Hervert. Cv. E. P. Bowles. J. Exp. Bot. 216: 809-812.
- Fasolo, F., Zimmerman, R. H., Fordham, I. y Falbo, L. 1988. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* cultured apples: effects of cytoquinin, auxin, and leaf age. Hort. Sci. 23: 755-760.
- Faure, O., Mengoli, M., Nougarede, A. y Bagni, N. 1991. Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis vinifera* J. Plant Physiol. 138: 545-549.
- Fehér, A., Pasternak, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F. y Dudits, D. 2001. Induction of the embryogenic pathway in somatic plant cells. Acta Hort. 560: 293-298.
- Fehér, A., Pasternak, T., Ötvös, K., Miskolczi, P. y Dudits, D. 2002. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. Biologia 57: 5-12.
- Fei, S. Z., Riordan, T. y Read, P. 2002. Stepwise decrease of 2,4D and addition of BA in subculture medium stimulated shoot regeneration and somatic embryogenesis in buffalograss. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 70: 275-279.
- Feirer, R. P., Mignon, G. y Litway, J. D. 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. Science 223: 1433-1435.
- Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S., Michaux-Ferriere, N. y Kahane, R. 2002. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium cepa* L.). Plant Cell Rep. 21: 197-203.
- Fernández, J. A., y Gómez-Gómez, L. 2002. Genómica y Mejora Vegetal. En: Nuéz, F., Carrillo, J. M. y Lozano, R.(eds.). Ingeniería Metabólica. Mundiprensa Libros S.A. pp 365-431
- Filonova, L., Bozhkov, P., Brukhin, V., Daniel, G., Zhivotovsky, B. y von Arnold, S. 2000. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. J. Cell. Sci. 113: 4399-4411.
- Find, J., Grace, L. y Krogstrup, P. 2002. Effect of antiauxins on maturation of embryogenic tissue cultures of nordmanns fir (*Abies nordmanniana*). Physiol. Plant. 116: 231-237.
- Foyer, C. H., López-Delgado, H., Dat, J. F. y Scout, I. M. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatizing stress tolerance and signalling. Physiol. Plant. 100: 241-254.
- Flores, H. E. 1990. Polyamines and plant stress. En: Flores H. E. (ed) Stress Responses in Plants : Adaptation and Acclimatization Mechanism. Wiley-Liss. Inc New York. pp 217-239.

Flores, H. E. y Galston, A. W. 1984. Osmotic stress induced polyamine accumulation in cereal leaves . Plant Physiol. 75: 102-113.

Flores, H. E. y Martín-Tanguy, J. 1991. Polyamines and plant secondary metabolites. En: Slocum, R. D., Flores, H. E. (eds.). Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. Florida: CRC Press Boca Raton, pp 57-76.

Franz, G., Hatzopoulos, P., Jones, T. J., Krauss, M. y Sung, Z. R. 1989. Molecular and genetic analysis of an embryonic gene, DC8, from *Daucus carota* L. Mol. Gen. Genet. 218: 143-151.

Fricker, M. D., May, M., Meyer, A. J., Sheard, N. S. y White, N. S. 2000. Measurement of glutathione levels in intact roots of *Arabidopsis* J. Microsc. 198: 162-173.

Fuentes-Cerda, C. F. J., Monforte-González, M., Mendez-Zeel, M., Rojas-Herrera, R. y Loyola- Vargas, V. M. 2001. Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by the nitrogen source. Biotech. Lett. 23: 1341-1343.

Fujimura, T. y Kosamine, A. 1975. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Sci. Lett. 5: 359-364.

Fujimura, T. y Kosamine, A. 1979. Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Z. Pflanzenphysiol. 95: 13-19.

Gainer, J. W., Chisholm, G. M. 1974. Oxygen diffusion and athersclerosis. Athersclerosis 19: 135-138.

Galun, E. y Breiman, A. 1997. Transgenic Plants. Imperial College Press, London, UK. 376 p.

Galston, A. W. y Flores, H. E. 1991. Polyamines and plant morphogenesis.- In Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants (R. D. Slocumand H. E. Flores, eds). Florida: CRC Press, Boca Raton. pp 175-186

Gautheret, R. J. 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. CR. Academy of Science (Paris) 208: 118-121.

Genovesi, A. D. y Collins, G. B. 1982. *In vitro* production of haploid plants of corm via anther culture. Crop Sci. 22: 1137-1144.

George, P. S, Visvanath, S., Ravishankar, G. A. y Venkataraman, L. V. 1992. Tissue culture of saffron (*Crocus sativus* L.): Somatic embryogenesis and shoot regeneration. Food Biotech. 6: 217-223.

George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology (2nd ed) (George, E. F. ed). Exegetics Ltd. Edington, Wilts, pp 575.

George, E. F. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2: In practice (2nd ed) (George, E. F. ed). Exegetics Ltd. Edington, Wilts, pp:575.

- Gheysen, G., Villarroel, R. y van Montagu, M. 1989. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Develop.* 5: 287-297.
- Gibeaut, D. M., Karuppiiah, N., Chang, S-R., Brock, T. G., Vadlamundi, B., Kim, D., Ghosheh, N. S., Rayle, D. L., Carpita, N. C. y Kaufman, P. B. 1990. Cell wall and enzyme changes during graviresponse of the leaf-sheat pulvinus of oat (*Avena sativa*). *Plant Physiol.* 94: 411-416.
- Goldblatt, P. y Takei, M. 1997. Chromosome cytology of Iridaceae patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of Karyotype change. *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 84: 285-304.
- Goldfarb, B., Howe, G. M., Hackett, W. P. y Monteuuis, O. 1996. Survival and growth of eastern white pine shoot apical meristem *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 46: 171-178.
- Goldsworthy, A. y Mina, M. G. 1991. Electrical patterns of tobacco cells in media containing indole-3-acetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Planta* 183: 373-386.
- Gonzalez, A., Arigita, L. Majada, J. y Sánchez, R. 1997. Ethylene involvement in *in vitro* organogenesis and plant growth of *Populus tremula* L. *Plant Growth Regul.* 22: 1-6.
- González, V. 1998. Cultivo de tejidos de *Crocus sativus* L: Producción de azafrán in vitro. Tesis Doctoral presentada en el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.
- Górecka, K. 1987. *In vitro* propagation of horse-radish (*Cochlearia armoracia* L.). *Acta Hort.* 212: 671-674.
- Goupil, P., Hatzopoulos, P., Franz, G., Hempel, F. D., You, R. y Sung, Z. R. 1992. Transcriptional regulation of a seed-specific carrot gene, DC8. *Plant Mol. Biol.* 18: 1049-1063.
- Graves, A. C. F. y Goldman, S. L. 1987. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the monocot genus *Gladiolus*: Detection and expression of T-DNA encoded genes. *J. Bacteriol.* 169: 1745-1746.
- Gray, D. J., Conger, B. V. y Hanning, G. E. 1984. Somatic embryogenesis in suspension and suspension-derived callus cultures of *Dactylis glomerata*. *Protoplasma.* 122: 196-202.
- Green, C. E., 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mais* L. En: Fujiwara A (ed) *Plant Tiss. Cult.* Maruzen, Tokyo. pp:107-108.
- Grilli Caiola, M. 1995. A study on pollen grains of *Crocus cartwrightianus* (Iridaceae). *Plant Syst. Evol.* 198: 155-166.

- Grimes, H. D. y Hodges, T. K. 1990. $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*oriza sativa* L.). J. Plant Physiol. 136: 362-367.
- Grossmann, K. 1990. Plant growth retardants as tools in physiological research. Physiol. Plant. 78: 640-648.
- Grossmann, K. 2000. Mode of action of auxinic herbicides: a new ending to a long, draw out story. Trends Plant Sci. 5: 506-508.
- Grossman, K., Hauser, C., Sauerbrey, E., Fritsch, H., Schmidt, O. y Jung, J. 1989. Plant growth retardants as inhibitors of ethylene production. J. Plant Physiol. 134: 538-543.
- Gutteridge, J. M. C. y Halliwell, B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem. Sci. 15: 129-135.
- Györgyey, J., Gartner, A., Németh, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle-Bors, E. y Dudits, D. 1991. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. Plant Mol. Biol. 16: 999-1007.
- Hadfy, K., Speth, V. y Neuhaus, G. 1998. Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. Development 125: 879-887.
- Hadrami, I. E. y D'Auzac, J. Effect of polyamine biosintetic inhibitor on somatic embryogenesis and cellular polyamines in *Hevea brasiliensis*. J. Plant Physiol. 140: 33-36.
- Halperin, W. y Wetherell, D. F. 1964. Adventive embryo in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. Am. J. Bot. 512: 274-283.
- Halperin, W. y Wetherell, D. F. 1965. Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. Nature 205: 519-520.
- Hammerschlag, F.A., Bauchan G. R. y Scorza, R. 1987. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 8: 235-242.
- Han, K. H., Meilan, R., Ma, C. y Strauss, S. H. 2000. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). Plant Cell Rep. 19: 315-320.
- Hanower, J. y Hanower, P. 1984. Inhibition et stimulation en culture *in vitro* de l'embryogenese des souches issues d'explant foliaires de palmier a huile. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 298, ser. III. 45-48.
- Hanning, G. E. y Conger, B. V. 1982. Embryoid and plantlet formation from leaf segments of *Dactylis glomerata*. Theor. Appl. Genet. 63: 155-159.

- Hansen, G. y Wrigth, M. S. 1999. Recent advances in transformation of agricultural plants. *Trends Plant Sci.* 4: 226-231.
- Harada, H. y Murai, Y. 1996. Micropropagation of *Prunus nume*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 46: 265-267.
- Hatzopoulos, P., Fong, F. y Sung, Z. R. 1990a. Absciscic acid regulation of DC8, a carrot embryonic gene. *Plant Physiol.* 94: 690-695.
- Hatzopoulos, P., Franz, G., Choy, L. y Sung, Z. R. 1990b. Interaction of nuclear factors with upstream sequences of a lipid body membrane protein gene from carrot. *Plant Cell* 2: 457-467.
- Havel, L. F. y Novák, F. J. 1988. Regulation of somatic embryogenesis and organogenesis in *Allium carinatum* L. *J. Plant Physiol.* 132: 373-377.
- Hays, D., Reid, D., Yeung, E. y Pharis, R. 2000. Role of ethylene in cotyledon development of microspore-derived embryos of *Brassica napus*. *J. Exp. Bot.*, 352: 1851-1859.
- Healt, R. L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J. P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D., Boutilier, K., Grossniklaus, U. y de Vries, S. C. 2001. The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* 127: 803-816.
- Heimer, Y. H., Mizrahi, Y. y Bachrach, U. 1979. Ornithine decarboxylase activity in rapidly proliferating plant cells. *FEBS Lett.* 104: 146-149.
- Helleboid, S., Chapman, A., Hendriks, T., Inze, D., Vasseur, J. y Hilbert, J. L. 2000. Cloning of beta 1.3 glucanases expressed during *Cichorium* somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 42: 377-386.
- Henry, R. J. 1997. Practical applications of Plant Molecular Biology. Chapman and Hall, London. 258 p.
- Hernández, J. A., Campillo, A., Alarcón, J. J. y Sevilla, F. 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.* 141: 241-251.
- Hernández, J. A., Ferrer, M. A., Jiménez, A., Ros Barceló, A. y Sevilla, F. 2001. Antioxidant Systems and $Q^{\cdot-}/H_2O_2$ Production in the Apoplast of Pea Leaves. Its Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. *Plant Physiol.* 127: 817-831
- Herrera-Estrella, L. 1983. Transfer and expression of foreign genes in plants. PhD thesis. Laboratory of Genetics, Gent University, Belgium.

- Hezari, M., Ketchum, R. B. E., Gibson, D. M. y Croteau, R. 1997. Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 337: 185-190.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. y Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis on the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282.
- Hiei, Y., Komari, T. y Kubo, T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35: 205-218.
- Higgins, W. S. y Stimart, D. P. 1990. Influence of *in vitro* generation temperature and post-*in vitro* cold storage on growth response of *Lilium longiflorum* bulblets. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115: 930-933.
- Hill, R. D., Liu, J. H., Durnin, D., Lamb, N., Shaw, A. y Abrams, S. R. 1995. Absciscic acid structure-activity relationships in barley aleurone layers and protoplasts (biological activity of optically active, oxygenated absciscic acid analogs). *Plant Physiol.* 108: 573-579.
- Hill, A., Nantel, A., Rock, C. D. y Quatrano, R. S. 1996. A conserved domain of the *viviparous-1* gene product enhances the DNA-binding activity of the bZIP factor EmBP-1 and other transcription factors. *J. Biol. Chem.* 271: 3366-3374.
- Hodges, D. M., Andrews, C. J., Johnson, D. A., Hamilton, P. I. 1997. Antioxidant enzyme responses to drilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *J. Exp. Bot.* 48: 1105-1113.
- Hollings, M. 1965. Disease control through virus-free stock. *Ann. Rev. Phytopath.* 3: 367-396.
- Homes, J., Legros, M. y Jaziri, M. 1987. *In vitro* Multiplication of *Crocus sativus* L. *Acta Hort.* 212: 675-676.
- Horemans, N., Foyer, C. H., Potters, G. y Asard, H. 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 531-540.
- Houman, F., Fei, H. M., Godbold, D. L., Majcherczyk, A., Shasheng, W. y Wang, S. 1991. Polyamines in leaves and roots of *Populus maximowiczii* growth in differing levels of potassium and phosphorus. *Can. J. For. Res.* 22: 1748-1751.
- Hu, C., Chee, P. P., Chesney, R. H., Zhou, J. H., Miller, P. D. y O'Brien, W. T. 1990. Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Rep.* 9: 1-5.
- Huang, Y., Diner, A. M., Karnosky, D. 1991. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*. *In Vitro Cell Dev Biol.* 27: 201-207.

- Huang, X. Y., Li, X. J., Li, Y. y Huang, L. Z. 2001. The effect of AOA on etilene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Physiol. Plant.* 113: 424-429.
- Huetteman, C. A. y Preece, J. E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 33: 105-119.
- Hussey, G. 1975a. Totipotence in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amarillidaceae. *J. Exp. Bot.* 26: 253-262.
- Hussey, G. 1975b. Propagation of hyacinths by tissue culture. *Sci. Hort.* 3: 21-28.
- Hussey, G. y Hilton, J. 1980. Sustained proliferation of adventitious shoots in bulbous genera. *Ann. Rep. John Innes Inst.* 10: 55-56.
- Ilan, A., Ziv, M. y Halevy, A. H. 1995. Propagation and corm development of Brodiaea in liquid cultures. *Sci. Hortic.* 63: 101-112.
- Iraqi, D. y Tremblay, M. 2001. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 111: 381-388.
- Isa, T. y Osawara, T. 1988. Efficient regeneration from the callus of saffron. *Japan J. Breed.* 38: 371-374.
- Isa, T., Ogasawara, T. y Kanero, H. 1990. Regeneration of saffron protoplasts immobilized in Ca-alginate Beads. *Japan J. Breed.* 40: 153-157.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. y Humashiro, T. 1996. High frequency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotechnol.* 14: 745-750.
- Ismanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Y. y Nakamura, K. 1998. Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. *Plant Mol. Biol.* 38: 1101-1111.
- Jain, A. y Srivastava, H. S. 1981. Effect of salicylic acid on nitrate reductase activity in maize seedlings. *Physiol. Plant* 51: 339-342.
- Jang, J-C. y Sheen, J. 1997. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.* 2: 208-214.
- Jasik, J. y Mantell, S. H. 2000. Effects of jasmonic acid and its methyl-ester on *in vitro* microtuberisation of three food yam (*Dioscorea*) species. *Plant Cell Rep.* 19: 863-867.

- Jähne, A., Becker, D. y Lörtz, H. 1995. Genetic engineering of cereal crop plants: a review. *Euphytica*. 85: 35-44.
- Jefferson, R. A., Kavanag, T. A. y Bevan, M. W. 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Jéhan, H., Courtois, D., Ehret, C., Lerch, K. y Pétierd, V. 1994. Plant regeneration of *Iris pallida* L. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. *Plant Cell Rep.* 13: 671-675.
- Jirage, D. B., Ravishankar, G. A., Suvarnalatha, G. y Venkataraman, V. 1994. Profile of polyamines during sprouting and growth of saffron. *J. Plant Growth Regul.* 13: 69-72.
- Jiménez, E., Pérez, N., de Feria, M., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M., Quiala, E. y Pérez, J. C. 1999. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 59: 19-23.
- Joersbo, M., Donaldson, I., Kreiber, J., Petersen, S. G., Bundsted, J. y Okkels, F. T. 1998. Analysis of manose selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Breed.* 4: 111-117.
- Joersbo, M. y Okkels, F. T. 1996. A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Rep.* 16: 219-221.
- Jones, O. P. 1976. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature* 262: 392-393.
- Jones, O. P. 1979. Propagation *in vitro* of apple trees and other woody fruit plants: methods and applications. *Sci. Hort.* 30: 44-48.
- Kageyama, Y., Honda, Y. y Sujimura, Y. 1995. Plant regeneration from patchouli protoplasts encapsuled in alginate beads. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 41: 65-70.
- Kairong, C., Gengsheng, X., Xinmin, L., Gengmei, X. y Yafu, W. 1999. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Sci.* 146: 9-16.
- Kamo, K. 1994. Effect of phytohormones on plant regeneration from callus of *Gladiolus* cultivar "Jenny Lee". *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30: 26-31.
- Kamo, K., Blowers, A., Smith, F. y Van Eck, J. 1995. Stable transformation of *Gladiolus* by particle gun bombardment of cormels. *Plant Sci.* 110: 105-111.
- Kamo, K. y Blowers, A. 1999. Tissue specificity and expression level of gusA under rolD, mannopine synthase and translation elongation factor 1subunit a promoters in transgenic *Gladiolus* plants. *Plant Cell Rep.* 18: 809-815.
- Kamo, K., Chen, J. y Lawson, R. 1990. The establishment of cell suspension cultures of *Gladiolus* that regenerate plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26: 425-430.

- Kamo, K. 1997. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated *gus* A expression and opine synthesis in *Gladiolus*. Plant Cell Rep. 16: 389-392.
- Karamian, R. y Ebrehimzadeh, H. 2001. Plantlet regeneration from protoplast derived embryogenic calli of *Crocus cancellatus*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 65: 115-121.
- Kaur-Sawhney, R. y Applewhite, P. B. 1993. Endogenous protein bound polyamines: correlation with regions of cell division in tobacco leaves, internodes and ovaries. Plant Growth Regul. 12: 223-227.
- Kawahara, R., Komamine, A. y Fukuda, H. 1995. Isolation and characterization of homeobox-containing genes of carrot. Plant Mol. Biol. 27: 155-164.
- Kawara, R., Sunabori, S., Fukuda, H. y Komamine, A. 1992. A gene expressed preferentially in the globular stage of somatic embryogenesis encodes elongation factor 1 α in carrot. Eur. J. Biochem. 209: 157-162.
- Kendrick, R. E. y Kronenberg, G. H. M. 1994. Photomorphogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kevers, C., Le Gal, N., Monteiro, M., Dommes, M. y Gaspar, T. 2000. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. Plant Growth. Regul. 31: 209-214.
- Keyhany, J., Keyhany, E. y Kamali, J. 2002. Thermal stability of catalases active in dormant saffron (*Crocus sativus* L.) corms. Molec. Biol. Rep. 29: 125-128.
- Khunachac, A., Chin, C. K., Lê, T. y Gianfagna, T. 1987. Promotion of asparagus shoot and root growth by growth retardants. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 11: 97-110.
- Kim, M. K., Somer, H. E. Bongarten, B. C. y Merkle, S. A. 1997. High frequency induction of adventitious shoots from hypocotyls segments of *Liquidambar styracifalu* L. by thidiazuron. Plant Cell Rep. 16: 536-540.
- Klein, T. M., Fromm, M. E., Wessinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sleeten, M. y Sandford, J. C. 1988. Tansfer of foreign genes into intact maize cells using high velocity micropart. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 4305-4309.
- Knittel, N., Griber, V., Hahne, G. y Lenée, P. 1994. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): a reliable protocol. Plant Cell Rep. 14: 422-425.
- Koch, K. E., 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 509-540.
- Kochba, J., Spiegel-Roy, P., Neumann, H., Saad S. 1978. Stimulation of embryogenesis in citrus ovular callus by ABA, Ethephon, CCC and Alar and its suppression by G A3. Z Pflanzenphysiol. 89: 427-432.

- Koda, Y. y Kikuta, Y. 1991 Possible involvement of jasmonic acid in yam plants. *Plant Cell Physiol.* 32: 629-633.
- Koda, Y. 1997. Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiol. Plant.* 100: 639-646.
- Kolomiets, M. V., Hannapel, D. J., Chen, H., Tymeson, M., Gladon, R. J. 2001. Lipoxigenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* 13: 613-626.
- Komai, F., Okuse, I., Saga, K. y Harada, T. 1996. Improvement on the efficiency of somatic embryogenesis from spinach root tissues by applying various sugars. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 65: 67-72.
- Komamine, A., Kawuhara, R., Matsumoto, M., Sunabori, S., Toya, T., Fujiwara, A., Tsukahara, M., Smith, J., Ito, M., Fukuda, H., Nomura, K. y Fujimura, T. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 28p: 125-131.
- Kong, L. y Yeung, E. C. 1994. Effects of ethylene and ethylene inhibitors on white spruce somatic embryo maturation. *Plant Sci.* 104: 71-80.
- Konosuke, S. y Himeno, H. 1987. In vitro proliferation of saffron (*Crocus sativus* L.) stigma. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 11: 159-166.
- Kovac, M. y Ravnikar, M. 1998. Sucrose and jasmonic acid interact in photosynthetic pigment metabolism and development of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Sante) grown *in vitro*. *Plant Growth. Regul.* 24: 101-107.
- Koyama, A., Ohmori, Y., Fujioka, N., Miyagawa, H., Yamasaki, K. y Kohda, H. 1987. Formation of stigma-like structures and pigment in cultured tissues of *Crocus sativus*. *Shoyakugaku Zasshi*, 41: 226-229.
- Krause, GH. 1994. The role of oxygen in photoinhibition of photosynthesis. En: Foyer C. H., Mullineaux, P. M., (eds.). *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*. Boca Raton: CRC Press, pp: 43-76
- Krishnaraj, S. y Vasil, I. K. 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. En: *In Vitro Embryogenesis in Plants*. T. A. (eds). Thorpe. pp 417-470.
- Krens, F. A., Molendijk, K., Wullens, G. J. y Schilperoort, R. A. 1982. In vitro transformation of plant protoplasts with Ti plasmid DNA. *Nature* 296: 72-74.
- Kutschera, U. 1994. The current status of the acid-growth hypothesis. *New Phytol.* 126: 549-569.
- Langeveled, S. A., Gerrits, M. M., Derks, A. F. L. M., Boonekamp, P. M. y Bol, J. F. 1995. Transformation of lily by *Agrobacterium*. *Euphytica* 85: 97-100.

- Lee, J., Vogt, T., Schmidt, J., Parthier, B. y Löbner, M. 1997. Methyl-jasmonate induced accumulation of coumaroyl conjugates in barley leaf segments. *Phytochemistry* 44: 589-592.
- Lee, T. M., Lur, H. S., Lin, Y. H. y Chu, C. 1996. Physiological and biochemical changes related to methyl jasmonate-induced chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Cell Env.* 19: 65-74.
- Le Nard, M. y Chanteloube, F. 1992. *In vitro* culture of explants excised from growing stems of tulip (*Tulipa gesneriana* L.); problems related to bud and bulblet formation. *Acta Hort.* 325: 435-440.
- Lehman, C.W., Trautman, J. K. y Carroll, D. 1994. Illegitimate recombination in *Xenopus*: characterisation of end-joined junctions. *Nucleic Acid Res.* 22: 434-442.
- Leslie, C. A. y Romani, R. J. 1986. Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 7: 144-146.
- Leslie, C. A. y Romani, R. J. 1988. Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. *Plant Physiol.* 88: 833-837.
- Levine, A., Pennell, R. I. Alvarez, M. E., Palmer, R. y Lamb, C. 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6: 427-437.
- Li, Z. y Burritt, D. J. 2003. Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. *Plant Growth Regul.* 40: 65-74.
- Li, Z., Upadhyaya, N. M., Meena, S., Gibbs, A. J. y Waterhouse, P. M. 1997. Comparison of promoters and selectable marker genes of use Indica rice transformation. *Mol. Breed.* 3: 1-14.
- Liljeen-Kipnis H. y Kochba, J. 1987. Mass propagation of new *Gladiolus* hybrids. *Acta Hort.* 212: 631-638.
- Liljeen-Kipnis, H., Ziv, M., Kahany, S. y Azizbekov, N. 1992. Proliferation and regeneration of *Nerine* in liquid culture. *Acta Hort.* 325: 467-474.
- Lin, X., Hwang, G. J. y Zimmerman, J. L. 1996. Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos. *Plant Physiol.* 112: 1365-1374.
- Linsmair, E. M. y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- Litz, R. E. y Schaffer, B. 1997. Polyamines in adventitious and somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.). *J. Plant Physiol.* 128: 251-258.

- Liu, C., Moon, K., Honda, H. y Kobayasi, T. Enhanced regeneration of rice (*Oriza sativa* L.) embryogenic callus by light irradiation in growth phase. J. Biosc. Bioeng. 91: 319-321.
- Liu, C. Z., Wang, Y. C., Guo, C., Fan, Q. Y., Ye, H. C. y Li, G. F. 1998. Production of artemisinin by shoot culture of *Artemisia annua* L. in a modified inner loop mist bioreactor. Plant Sci. 135: 211-217.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V. Marazziti, D., Veraga, R., Orselli, S. y Terzi, M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by maturation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs. Theor. Appl. Genet. 77: 325.
- Lorenzo, J. C., Blanco, M. A., Peláez, O., González, A., Cid, M., Iglesias, A., González, B., Escalona, M., Espinosa, P. y Borroto, C. 2001. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 65: 1-8.
- Lorenzo, J. C., González, B. L., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P. y Borroto, C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 54: 197-200.
- Lörz, H., Larkin, P. J., Thomson, J. y Scowcroft, W. R. 1983. Improved protoplast culture and agarose media. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2: 217-226.
- Loskutov, A.V., Beninger, C. W., Ball, T. M., Hosfield, G. L., Nair, M. y Sink, K. C. 1999. Optimisation of *in vitro* conditions for stigma-like-structure production from half-ovary explants of *Crocus sativus* L. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 35: 200-205.
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K. M., West, M. A. L., Lo, R., Kwong, R. W., Yamagishi, K., Fischer, R. L., Goldberg, R. B. y Harada, J. J. 1998. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDONI is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. Cell 93: 1195-1205.
- Lu, C., Vasil, I. K. y Ozias-Akins, P. 1982. Somatic embryogenesis in *Zea mays*. Theor. Appl. Genet. 62: 109-112.
- Lu, C. y Vasil, I. K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. Theor. Appl. Genet. 59: 275-280.
- Lu, C. y Vasil, I. K. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Panicum maximum* Jacq. Am. J. Bot. 69: 77-81.
- Lynn, J. y Hanmat, N. 2000. Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St Keverne. Plant Sci. 150: 209-216.

- Mader, J. C. 1999. Effects of jasmonic acid, silver nitrate and LAOPP on the distribution of free and conjugated polyamines in roots and shoots of *S. tuberosum* *in vitro*. J. Plant Physiol. 154: 79-88.
- de Marco, A. y Roubelakis-Angelakis, K. A. 1996. The complexity of enzymic control of hydrogen peroxide concentration may affect the regeneration potential of plant protoplasts. Plant Physiol. 110: 137-145.
- Marcotte Jr, W.R., Bayley, C. C. y Quatrano, R. S. 1988. Regulation of a wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts. Nature 335: 454-457.
- Marraccini, P., Deshayes, A., Petiard, V. y Rogers, W. J. 1999. Molecular cloning of the complete 11s seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. Plant Physiol. Biochem. 37, 4: 273-282.
- Martinelli, A. 1985. Factors affecting *in vitro* propagation of the peach- almond hybrids "Hansen 2168" and "Hansen 536". Acta Hort. 173: 237-244.
- Martin-Tanguy, J. (1985). The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. Plant Growth Regul. 3: 381-399.
- Martin-Tanguy, J. 1997. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. Physiol. Plant. 100: 675-688.
- Martinez, C., Blanc, F., Le Caire, E., Besnard, O., Nicole, M. y Baccou, J. L. 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. Plant Physiol. 127 : 334-344.
- Martre, P., Lacan, D., Just, D. y Teisson, C. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 67: 25-35.
- Mathew, B. 1982. The *Crocus*. A revision of the Genus *Crocus*. Brastford. London.
- McElroy, D. y Brettell, R. 1994. Foreign expression in transgenic cereals. Trends Biotechnol. 12: 62-68.
- McElroy, D., Blowers, A. D., Jenes, B. y Wu, R. 1991. Construction of expression vectors based on rice actin 1 (Act 1) 5' region for use in monocot transformation studies. Mol. Gen. Genet. 231: 150-160.
- McCord, J. M. y Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein. J. Biol. Biochem. 244: 6049-6055.
- Mehdy, M. C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant Physiol. 105: 467-472.

Meijer, E. G. M. y Brown, D. C. M. 1987. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 10: 11-19.

Meijer, E. G. M. y Brown, D. C. M. 1988. Inhibition of somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* by aminoethoxyvinylglycine, amino-oxyacetic acid, 2,4-dinitrophenol, and salicylic acid at concentrations which do not inhibit ethylene biosynthesis and growth. J. Exp. Bot. 39: 263-270.

Mengoli, M. y Bagni, N. 1992. Polyamines and somatic embryogenesis in higher plants. Newsletter. 68: 2-8.

Minocha, R., Kvaalen, H., Minocha, S. C. y Long, S. 1993. Polyamines in embryogenic cultures of Norway spruce (*Picea abies*) and red spruce (*Picea rubens*). Tree Physiol. 13: 365-377.

Minocha, S. C. y Minocha, R. 1995. Role of polyamines in somatic embryogenesis. En: Bajaj YPS ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds 1. Berlin: Springer-Verlag. Vol 30, pp 53-70.

Minocha, R., Minocha, S. C., Simola, L. K. 1995. Somatic embryogenesis and polyamines in woody plants En: Jain S. M., Gupta P. K. Newton RJ eds Somatic embryogenesis in woody plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Vol 1, pp 337-359.

Minocha, R.; Smith, D. R.; Reeves, C.; Steele, K. D. y Minocha, S. C. 1999. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. Physiol Plant. 105: 155-164.

Miyamoto, K., Oka, M. y Ueda, J. 1997. Update on the possible mode of action of the jasmonates: Focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development. Physiol. Plant. 100: 631-638.

Mok, M. C., Mok, D. W. S. y Armstrong, D. J. (1982). Cytoquinin activity of N-phenyl-N-1.2.3-thiadiazol-5-yl urea (thidiazuron). Histochem. 21:1509-1511.

Montagno, T. J., Jourdan, P. S. y Berry, S. Z. 1991. Plant regeneration from leaf protoplast of *Licopersicon hirsutum* F. *hirsutum*. Plant Cell Rep. 9: 680-683.

Montague, M. J., Koppenbrink, J. W. y Jaworski, E. G. 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I-Changes in intracellular content and rates of synthesis. Plant. Physiol., 62: 430-433.

Montague, M. J. Armstrong, T. A. y Jaworski, E. G. 1979. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. II-Changes in arginine decarboxylase activity. Plant Physiol. 63: 341-345.

Monteiro, M., Kevers, C., Dommes, J. y Gaspar, T. H. 2002. A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 68: 225-232.

- Mordhorst, A. P., Toonen, M. A. J. y de Vries, S. C. 1997. Plant embryogenesis. Crit. Rev. Plant. Sci. 16: 535-576.
- Morel, G. 1960. Producing virus free *Cymbidium*. American Orchid Society Bulletin 29: 495-497.
- Morel, G. 1964. Tissue culture- a new means of clonal propagation in orchids. American Orchid Society Bulletin. 33: 473-478.
- Morel, G. y Martín, C. 1952. Guérison de dahias atteints d'une maladie á virus. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 235:1324-1325.
- Morel, G. y Martín, C. 1955. Curing potatoes infected with virus. Compt. Rend. Hebd. Séance Acad. Agric. Fr, 41: 472-473.
- Morrish, F., Songstad, D. D., Armstrong, C. L. y Fromm, M. 1993. Microprojectile bombardement: a method for the production of transgenic cereal crop plants and the functional analysis of genes. En: Hiatt A ed, Transgenic plants: fundamentals and applications. Marcel Dekker, New York, pp 133-171.
- Müller, A. J. y Grafe, R. 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. Mol. Gen. Genet. 161: 67-76.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.
- Murthy B. N. S., Murch, S. J. y Saxema, P. K. 1995. Thidiazuron induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea* L): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. Physiol. Plant. 94: 268-276.
- Negbi, M. 1999. Saffron (*Crocus sativus* L.). Medicinal and Aromatic plants- Industrial Profiles. Harwood Academic Publishers. OPA (Overseas Publishers Association). Singapore.
- Negbi, M., Dagan, B., Dror, A. y Basker, D. 1989. Growth, flowering, vegetative reproduction, and dormancy in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.) Israel J. Bot. 38: 95-113.
- Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A. R. y Hansen, G. 2000. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. Plant Cell Rep. 19: 798-803.
- Niimi, Y. 1984. Bulblet productivity of explants from scale leaves, stems and petals of *Lilium rubellum* Baker. Sci. Hort. 22: 391-394.
- Niimi, Y. y Onozawa, T. 1979. *In vitro* bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum*. Sci. Hort. 11: 379-390.

- Nitsch, J. P. 1972. Haploid plant from pollen. *Z. Pflanzenzuchtz.* 67: 3-18.
- Nobecourt, P. 1939. Sur la perennité et l'augmentation de volume des cultures des tissus végétaux. *C. R. Seances Soc. Biol. Ses. Fil.* 130: 1270-1271.
- Nojiri, H., Yamane, H., Seto, H., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Yoshihara, T. y Shibaoka, H. 1992. Qualitative and quantitative analysis of endogenous jasmonic acid in bulbing and non-bulbing onion plants. *Plant Cell Physiol.* 33: 1225-1231.
- Novak, F. J., Afza, R., Van Duren, M., Perea-Dallos, M., Conger, B. V. y Xiaolang Taang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (Abb) bananas (*Musa* spp). *Biotechnol.* 7: 154-159.
- Novak, F.J. y Konecna, D. 1982. Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of Alfalfa (*Medicago sativa*). *Pflanzenphysiol.* 105: 279-288.
- Okazaki, K. y Koizumi, M. 1995. Callus formation and regeneration of some species of *Lilium*. *Acta Hort.* 392: 97-106.
- Oliveira, M. M. y Pais, M. S. S. 1991. Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinia deliciosa* var *deliciosa* cv. Hayward (Kiwifruit). *Plant Cell Rep.* 9: 643-646.
- Opatma, J., Novak, P. y Opatmy, Z. 1997. Paclobutrazol stimulates bud regeneration in *Solanum tuberosum* L. Primary explant cultures. *Biol. Plant.* 39: 151-158.
- Ozias-Akins, P. 1989. Plant regeneration from immature somatic embryos of peanut. *Plant Cell Rep.* 8: 217-218.
- Ozcan, S., Barghchi, M. Firek, S. y Draper, J. 1993. Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embryogenesis in pea. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34: 271-277.
- Ow, D. W., Wood, K. V., DeLuca, M., DeWey, J. R., Helinski, D. R y Howell, S. H. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4870-4874.
- Owens, L. D. y Smigocki, A. C. 1988. Transformation of soybean cells using mixed strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phenolic compounds. *Plant Physiol.* 88: 570-573.
- Palma, J. M, Garrido, M., Rodríguez-García, M. I. y Río, L. A. 1991. Peroxisome proliferation and oxidative stress mediated by activated oxygen species in plant peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 287: 68-74.
- Pang, S., DeBoer, D. L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J. G., Neher, M. K., Armstrong, C. L., Fry, J. E., Hinchee, M. A. W. y Fromm, M. E. 1996. An improved green-fluorescence protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* 112: 893-900.
- Papachtzi, M. 1981. In vitro propagation of *Hosta decorate* using cultures shoot tips. *Am. Soc. Hort.* 106: 232-236.

- Papas, P. W. 1971. The use of a chrome alum-gelatin (subbing) solution as a general adhesive for paraffin sections. *Strain Technol.* 46: 121-124.
- Pedroso, C. M., Primikiris, N., Roubelakis-Angelakis, K. A. y Pais, M. S. 1997. Free and conjugated polyamines in embryogenic and non-embryogenic leaf regions of camellia leaves before and during direct somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.* 101: 213-219.
- Pfeiffer, I. y Kutschera, U. 1995. Sucrose metabolism and cell elongation in developing sunflower hypocotyls. *J. Exp. Bot.* 46: 631-638.
- Pennell, R. I., Janniche, L., Scofield, G. N., Booij, H., de Vries, S. C. y Roberts, K. 1992. Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *J. Cell. Biol.* 119: 1371-1380.
- Phillips, G. C. y Hubstenberger, J. F. 1987. Plant regeneration *in vitro* of selected *Allium* species and interspecific hybrids. *Hort. Sci.* 22: 124-125.
- Pierik, R. L. M. 1969. Factors affecting adventitious root formation in isolated stem segments of *Rhododendron*. *Neth. J. Agric. Sci.* 17: 203-208.
- Pierik, R. L. M. y Steegmans, H. H. M., 1975. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. *Sci. Hort.* 3:1-20.
- Plessner, O., Negbi, M., Ziv, M. y Basker, D. 1989. Effects of temperature on the flowering of the saffron crocus (*Crocus sativus*): induction of hysteranthly. *Israel J. Bot.* 38: 1-7.
- Plessner, O., Ziv, M. y Negbi, M. 1990. In vitro corm production in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20: 89-94.
- Piqueras, A., Gomez, R., Han, B. H. y Deberg, P.C. 1995. Micropropagation of saffron (*Crocus sativus*) by microcorm regeneration. *Med. FAC. Landbouww. Univ. Gent*, 60/4a.
- Piqueras, A., Han, B. H., Escribano, J., Rubio, C., Hellín, E. y Fernández, J. A. 1999. Development of cormogenic nodules and microcorms by tissue culture, a new tool for the multiplication and genetic improvement of saffron. *Agronomie* 19: 603-610.
- Piqueras, A., Cortina, M., Serna, M. D. y Casas, J. L. 2001. Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. *Plant Sci.* 162: 671-678.
- Poincha, G. 1991. Research on *in vitro* propagation of *Prunus Saurocerasus* cv Otto Luyken. *Acta Hort.* 300: 177-180.
- Pretova, A. y Williams, E. G. 1986. Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Plant Physiol.* 126: 155-161.

- Price, A. H. 1990. A possible role for calcium in oxidative plant stress. *Free Rad. Res. Commun.* 10: 345-349.
- Puchta, H. 1998. Repair of genomic double-strand breaks in somatic cells by one-side invasion of homologous sequences. *Plant J.* 13: 331-339.
- Puntarulo, S., Galleano, M., Sanchez, R. A. y Boveris, A. 1991. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochem. Biophys. Acta.* 1074: 277-283.
- Quiroz-Figueroa, Fm, Méndez-Zeel, M., Larqué-Saavedra, A. y Loyola-Vargas, V. M: 2001. Picomolar concentrations of salycates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea Arabica* tissue culture. *Plant Cell Rep.* 20: 679-684.
- Quiroz-Figueroa, F., Mendez-Zeel, M., Sánchez-Teyer, F., Rojas-Herera, R. y Loyola-Vargas, V. M. 2002. Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica*. Short Communication. *Plant Physiol.* pp: 1-4.
- Radojević, L. y Subotic, A. 1992. Plant regeneration of *Iris setosa* Pall. through somatic embryogenesis and organogenesis. *J. Plant Physiol.* 139: 690-696.
- Rajashekar, G., Palmquist, D. E. y Ledbetter, C. A. 1995. *In vitro* screening procedure for osmotic tolerance in *Prunus*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 41: 159-164.
- Rajesh, M .K.; Radha, E.; Karun, A. y Parthasarathy, V. A. 2003. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm - the effect of exogenous polyamines. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 75: 41-47.
- Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P. y Lazzeri, P. A. 1999. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Rep.* 19: 118-127.
- Rashid, H., Yokoi, K. y Hinata, K. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. *Plant Cell Rep.* 15: 727-730.
- Ravnikar, M., Vilhar, B. y Gogala, N. 1992. Stimulatori effect of jasmonic acid on potato stem node and protoplast culture. *J. Plant Growth Regul.* 11: 29-33.
- Ravnikar, M., Zel, J., Plaper, I. y Spacapan, A. 1993. Jasmonic acid stimulates shoot and bulb formation of garlic *in vitro*. *J. Plant Growth Regul.* 12: 73-77.
- Ravnikar, M., Poljsak-Ptjatelj, M., Mavric, I., Strukelj, B. y Kregar, I. 1995. Jasmonic acid induces starch and defence related proteins accumulation in potato plantlets grown in vitro. *Acta Chimica Slovenica.* 42: 451-457.
- Reinert, J. 1958. Morphogenese und ihre kontrolle an gewebe-kulturen aus carotten. *Naturwissenschaften* 45: 344-345.

- Ricardo, C. P. P. y Ap Rees, T. 1970. Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry* 9: 239-247.
- Richards, H. A., Rudas, V. A., Sun, H., McDaniel, J. K., Tomaszewski, Z. y Conger, B. V. 2001. Construction of a GFP-BAR plasmid and its use for switchgrass transformation. *Plant Cell Rep.* 20: 48-54.
- Riera, R., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. y Tiburcio, A. F. 1997. Regeneration of *narcissus* plants influenced by dap. *Acta Hort.* 447:179-184.
- Ringe, F. y Nitsch, J. P. 1968. Conditions leading to flower formation on excised *Begonia* fragments cultured *in vitro*. *Plant Cell Physiol.* 9: 374-377.
- Ringe, F. 1972. Forderung der Zellproliferation unter der Einwirkung von 2-Chlorathylphosphosaure bei Explantaten von *Begonia x richmondensis* in steriler Kultur. *Z. Pflanzenphysiol.* 67: 45-48.
- Del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., López-Huertas, E., Palma, J. M., Pastori, G. M. 1998. Activated oxygen-mediated metabolic functions of lead peroxisomes. *Physiol. Plant.* 104: 673-680.
- Ritala, A., Mannonen, L., Aspergren, K., Salmenkallio-Marttila, M., Kurten, U., Hannus, R., Mendez-Lozano, J., Teeri, T. H. y Kauppinen, V. 1993. Stable transformation of barley tissue culture by particle bombardement. *Plant Cell Rep.* 12: 435-440.
- Robert, A., Creelman, R. A. y Mullet, J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 355-381.
- Robinson, K. E. P. y Adams, D. O. 1987. The role of ethylene in regeneration of *Helianthus annuus* (sunflower) plants from callus. *Physiol. Plant.* 71: 151-156.
- Roustan, JP., Latche, A, Fallot, J. 1989. Effect de l'acide acétylsalicylique sur la production d'étilene et l'embryogenèse somatique de suspensions cellulaires de carotte (*Daucus carota* L.). *C. R. Acad. Sci. Ser. C.* 308: 395-399.
- Sage, D. O., Lynn, J. y Hammat, N. 2000. Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St Keverne. *Plant Sci.* 150:209-216.
- Salin, M. L. 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plantarum.* 72: 681-689.
- Samosir, Y. M. S., Adkins, S. W., y Godwin, I. D. 2001. Assessment of promoters for genetic transformation in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Netword news.* December 2001 Burotrop Bulletin No.16
- Sanford, J.C. 1988. The biolistic process. *Trends Biotechnol.* 6: 299-302.

- Santa-Cruz, A., Estan, M. T., Rus, A., Bolarin, M. C. y Acosta, M. 1997. Effects of NaCl and Manitol Iso-Osmotic Stresses on the Free Polyamine Levels in Leaf Discs of Tomato Species Differing in Salt Tolerance. *J. Plant Physiol.* 151: 754-758.
- Santanen, A. y Simola, L. K. 1992. Changes in polyamines metabolism during somatic embriogénesis in *Picea abies*. *J. Plant Physiol.* 147: 145-153.
- Santarém, E. R., Trick, H. N., Essig, J. S. y Finer, J. J. 1998. Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimisation of transient expression. *Plant Cell Rep.* 17: 752-759.
- Santos, I. y Salema, R. 2000. Promotion by jasmonic acid of bulb formation in shoot cultures of *Narcissus triandrus* L. *Plant. Growth. Regul.* 30: 133-138.
- Sarangi, B. K., Kuchnuk, N. y Gleba, Y. Y. 1992. Isolation and culture of protoplasts of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Cell Rep.* 11: 462-465.
- Sarma, K. S., Maesato K., Hara, T. y Sonoda, Y. 1990. *In vitro* production of stigma-like structures from stigma explants of explants of *Crocus sativus*. *J. Exp Bot.* 41: 227: 745-748.
- Sato, Y., Sugiyama, M., Komamine, A. y Fukuda, H. 1995. Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* during tracheary element differentiation. *Planta* 196: 141-147.
- Schauf, C. L., Bringle, B. y Stillwell, W. 1987. Membrane-directed effects of the plants hormones abscisic acid, indole-3-acetic acid and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143: 1085-1091.
- Schiavone, F. M. and Cooke, T. J. 1987. Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cell Diff.* 21: 53-62.
- Schmidt, E. D., Guzzo, F., Toonen, M. A. y De Vries, S. C. 1997. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development.* 124: 2049-2062.
- Schnabl, H. y Youngman, R. J. 1983. Maintenance of plant cell membrane integrity and function by the immobilization of protoplasts in alginate matrices. *Planta* 158: 392-397.
- Schöpke, C., Taylor, N. J., Cárcamo, R., Beachy, R. N. y Fauquet, C. 1997. Optimisation of parameters for particle bombardment of embryogenic cultures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using computer image analysis. *Plant Cell Rep.* 16: 526-530.
- Schuppler, U., He, P-H., John, P. L. C. y Munns, R. 1998. Effect of Water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol.* 117: 667-678.

Schwann, T. 1839. Mikroskopische untersuchungen über die uberrcinstimmeingin der strukteer un dem wachstume der iere und pflanzen. Leipzig W Englemans 1976. Oswalds Klassiker der Exakten Wissenschaften p 1917.

Scoccianti, V., Sgarbi, E., Fraternale, D. y Biondi, S. 2000. Organogenesis from *Solanum melogena* L. (eggplant) cotyledon explants is associated with hormone-modulated enhancement of polyamine biosynthesis and conjugation. *Protoplasma*. 211: 51-63.

Scott, K. J., Daly, J. y Smith, H. H. 1964. Effects of indolacetic acid and kinetin on activities of enzymes of the hexose monophosphate shunt in tissue cultures of *Nicotiana*. *Plant Physiol*. 39: 709-712.

Scott, P. y Lyne, R. L. 1994. The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. 36: 129-133.

Seabrook, J. E. A. 1990. *Narcissus* (Daffodil). En: Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. y Bajaj, P. S. (eds.). *Handbook of Plant Cell Cultura*. McGraw-Hill. New York. pp 577-597

Selles, M., Villadomat, F., Bastida, J. y Codina, C. 1999. Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confuses*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Rep*. 18: 646-651.

Serrano, M., Martínez-Madrid, M. C., Riquelme, F. y Romojaro, F. 1995. Endogenous levels of polyamines and abscisic acid in pepper fruits during growth and ripening. *Physiol. Plant*. 95: 73-76.

Serres, R., Read, P., Hackett, W. y Nissen, P. 1990. Rooting of American chestnut microcuttings. *J. Environ. Hort*. 8: 86-88.

Sharma, P. y Rajam, M. V. 1995. Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embriogénesis from different regions of hypocotyls of eggplant (*Solanum melongea* L). *J. Plant Physiol*. 146: 658-664.

Sharp, W. R., Sondahl, M. R., Caldas, L. S. y Maraffa, S. B. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev*. 2: 268-310.

Sheen, J. 1996. Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transductions in plants. *Science* 274: 1900-1902.

Sheikholeslam, S. N. y Weeks, D. P. 1987. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol*. 8: 291-298.

Shibli, R. A., Ajlouni, M. M., Jaradat, A., Aljanabi, S. y Shatnawi, M. 1997. Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). *Sci. Hort*. 68: 237-242.

- Shoeb, F., Yadav, J. S. Bajaj, S. y Rajam, M. V. 2001. Polyamines as biomarkers for plant regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Sci.* 160: 1229-1235.
- Shoji, T., Yamada, Y. y Hashimoto, T. 2000. Jasmonate induction of putrescine *N*-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris* *Plant Cell Physiol.* 41: 831-839.
- Shuppler, U., He, P-H., Jonh, P: C. L. y Munns, R.1998. Effect water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol.* 117: 667-678.
- Siminis, C. I., Kanaellis, A. K. y Roubelakis-Angelakis, K. A. 1994. Catalase is differentially expressed in dividing and non dividing protoplasts. *Plant Physiol.* 105: 1375-1383.
- Singh, S. K. y Syamal, M. M. 2001. A short pre-culture soak in thidiazuron or forchlorfenuron improves axillary shoot proliferation in rose micropropagation. *Sci. Hort.* 91: 169-177.
- Silveira, V.; Floh, E. I. S.; Handro, W. y Guerra, M. P. 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76: 53-60.
- Simpkins, I., Walkey, D. G. A. y Neely, H. A. 1981. Chemical suppression of virus in cultured plant tissues. *Ann. Appl. Biol.* 99: 161-169.
- Skotland, T. y Ljones, T. 1980. Direct spectrophotometric detection of ascorbate free radical formed by dopamine-monoxygenase and ascorbate reductase. *Biochim. Biophys. Acta.* 630: 30-35.
- Smith, E. F. y Townsend, C. O. 1907. A plant tumour of bacterial origin. *Science* 25: 671-673.
- Smith, T. A. 1985. Polyamines. *Ann Rev. Plant Physiol.* 36: 117-143.
- Smith, D. L., y Kirkorian, A. D. 1990. Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep.* 9: 468-470.
- Smith, T.A., Negrel, J. y Bird, C.R. 1983. The cinnamic acid amides of the di- and polyamines. En: Bachrach U, Kaye A, Chayen R, eds. *Advances in Polyamine Research*. New York: Raven, Vol 4. pp: 347-370.
- Snir, I. y Erez, A. 1980. *In vitro* propagation of Maling Merton apple rootstocks. *Hort. Sci.* 15: 597-598.

- Sofiari, E., Raemakers, C. J. J. M., Kanju, E., Danso, K., Van Lammeren, A. M., Jacobsen, E. y Visser, R. G. F. 1997. Comparison of NAA and 2,4D induced somatic embryogenesis in Cassava. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 50: 45-56.
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J. G., Ohlrogge, J. B. 2000. Lipids. En: Buchanan B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plants Physiologists 456-527.
- Somleva, M. N., Schmidt, E. D. L. y de Vries, S. C. 2000. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep.* 19: 718-726.
- Sopory, S. K. y Maheshwari, S. C. 1978. Production of monohaploids embryos and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*. *Plant Sci. Lett.* 12: 47-54.
- Sorvari, S. 1986. The effect of starch gelatinised nutrient media in barley anther cultures. *Ann. Agric. Fenn.* 25: 249-254.
- Stasolla, C. y Yeung, E. C. 2001. Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination. *Physiol. Plant.* 111: 196-205.
- Staswick, P. E. 1994. Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 303-322.
- Stefaniak, B. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Gladiolus* (*Gladiolus. Hort.*). *Plant Cell Rep.* 13: 386-389.
- Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G. A., Van Kammen, A. y De Vries, S. C. 1991. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3: 907-921.
- Steward, F. C., Mapes, M. O. y Hears, K. 1958. Growth and division of freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45: 705-708.
- Stone, O. M. 1973. The elimination of viruses from *Narcissus tazetta* cv. Grand Soleil d'or, and rapid multiplication of virus-free clones. *Ann. Appl. Biol.* 73: 45-52.
- Stone, S. L., Kwong, L. W., Yee, K. M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R. L., Goldberg, R. B. y Harada, J. J. 2001. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11806-11811.
- Straub, P. F., Decker, D. M. y Gallagher, J. M. 1988. Tissue culture and long-term regeneration of *Phramites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 15: 73-78.
- Sturm, A. 1999. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* 121: 1-7.

Sugiura, M., Shoyama, Y., Saito, H. y Nishiyama, N. 1995. Crocin improves the ethanol-induced impairment of learning behaviours of mice in passive avoidance tasks. *Proceedings of the Japan Academy Series B Physical and Biological Science*. 71: 319-324.

Sugiura, M., Shoyama, Y., Zhang, Y. X., Saito, H. y Abe, K. 1996. Effects of ethanol extracts of *Crocus sativus* L. and its purified chemicals on learning behavior and long-term potentiation. *Preclinical and Clinical Strategies for the Treatment of Neurodegenerative, Cerebrovascular and Mental Disorders* (Series: International Academy for Biomedical and Drug Research). 11: 270-276.

Sutton, J. 1978. The production of virus-free gladioli using meristem culture. XXth Int. Hort. Cong. (Abst. 1888).

Takahashi, K., Fujino, K., Kikuta, I. y Koda, Y. 1995. Involvement of the accumulation of sucrose and the síntesis of cell wall polysaccharides in the expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci*. 111: 11-18.

Takayama, S. y Misawa, M. 1979. Differentiation in *lilium* bulb scales grown *in vitro*-effect of various cultural conditions. *Physiol. Plant*. 46: 184-190.

Takayama, S. y Misawa, M. 1982. Factors affecting differentiation and growth *in vitro*, and mass propagation scheme for *Begonia x hiemalis*. *Sci. Hort*. 16: 65-75.

Teisson, C., Alvard, D., Berthouly, M., Cote, F., Escalant, J. V., Etienne, H. y Lartaud, M. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. En: Kozai, T., Kubota, C., Fujiwara, K., Ibaraki, Y. y Ishs, S. S. (eds.). *Proceedings of the International Symposium on Plant Production in Closed Ecosystems. Automation Culture and Environement*. Narita. Japan. pp.521-526.

Teisson, C. y Alvard, D. 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. En: Terri M. Cella, R. y Falavigna A. (eds.). *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. pp 105-110.

Teisson, C. y Alvard, D. 1999. *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Res*. 42: 499-504.

Tian, M., Gu, Q. y Zhu, M. 2003. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Sci*. 165: 701-707.

Toldi, O., Gyulai, G., Kiss, J., Tamas, I.A. y Balázs, E. 1996. Antiauxin enhanced initiation and plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugarbeet (*Betavulgaris* L.). *Plant Cell Rep*. 15: 851-854.

Thomas, J. C. y Katterman, F. R. 1986. Cytokinin activity induced by thidiazurin. *Plant Physiol*. 81: 681-683.

Thorpe, T. A. y Meier, D. D. 1972. Starch metabolism, respiration and shoot formation in tobacco callus cultures. *Physiol. Plant.* 27: 365-369.

Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S. y Brettel, R. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11: 1369-1376.

Torrigiani, P., Altamura, M. M., Capitán, F., Serafini-Fracassini, D. y Bagni, N. 1989. De novo root formation in thin layer cultures of tobacco: changes in free and bound polyamines. *Physiol. Plant.* 77: 294-301.

Torrigiani, P., Altamura, M. M., Pasqua, G., Monacelli, B., Serafini-Fracassini, D. y Bagni, N. 1987. Free and conjugated polyamines during *de novo* floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco. *Physiol. Plant.* 70: 453-460.

Tran Thanh Van, M. 1973. Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 119: 149-159.

Tremblay, F. M. y Lalonde, M. 1984. Requeriments for *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 3: 189-199.

Tremblay, F. M., Nesme, X. y Lalonde, M. 1984. Selection and micropropagation of nodulating and non-nodulating clones of *Alnus crispa* (Ait). *Pursh. Plant & Soil.* 78: 171-179.

Trick, H. N. y Finer, J. J. 1997. SAAT: Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Res.* 6: 329-337.

Trurksa, M., Samuel, L., MacKenzie y Qiu, X. 2003. Molecular analysis of flax 2S storage protein conlinin and seed specific activity of its promoter. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 2: 141-147.

Tubaro, F., Micossi, E. y Ursini, F. 1996. The antioxidant capacity of complex mixtures by kinetic analysis of crocin bleaching inhibition. *Free Radical Biol. Med.* 24: 1228-1234.

Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M. y Ursini, F. 1998. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 173-179.

Tyburski, J. y Tretyn, A. 2004. The role of light and polar auxin transport in root regeneration from hypocotyls of tomato seedling cuttings. *Plant Growth Regul.* 42: 39-48.

Ulloa, R. M., Raíces, M., Macintosh, G. C., Maldonado, S. y Téllez-Iñón, M. T. 2002. Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Planta.* 115: 417-427.

- Ulrich, T. H., Wurtele, E. S., y Nikolau, B. J. 1990. Sequence of EMB-1, an mRNA accumulating specifically in embryos of carrot. Nucl. Acids. Res. 18: 2826.
- Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F., Pompon, D. 1997. Cloning, yeast expression and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-citocrome P450 CYP73A5. Journal of Biological Chemistry. 272: 19176-19186.
- Utsuno, K., Shikanai, T., Yamada, Y. y Hashimoto, T. 1998. AGR, an *Agritopic* locus of *Arabidopsis thaliana*, encodes a novel membrane protein family member. Plant Cell Physiol. 39: 1111-1118.
- Vain, P., McMullen, M. D. y Finer, J. J. 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. Plant Cell Rep. 12: 84-88.
- Vain, P., Worland, B., Kohli, A., Snape, I. W. y Christou, P. 1998. The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. Theor. Appl. Genet. 96: 164-169.
- Van Breusegem, F. M., Vranova, E., Dat, J. F. e Inze, D. 2001. The role of active oxygen in plant signal transduction. Plant Sci. 161: 405-414.
- Van der Geest, A. H. M. y Petolino, J. F. 1998 Expression of a modified green fluorescent protein gene in transgenic maize plants and progeny. Plant Cell Rep. 17: 760-764.
- Van Overbeek, J., Conklin, M. E. y Blakeslee, A. F. 1941. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. Science 94: 350-351.
- Van Overbeek, J., Conklin, M. E. y Blakeslee, A. F. 1942. Cultivation *in vitro* of small *Datura* embryos. Am. J. Bot. 29: 472-477.
- Vasil, V., Brown, S. M., Re, D., Fromm, M. E. y Vasil, I. K. 1991. Stable transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. Bio/Technology 9: 743-747.
- Victor, J. M. R., Murch, S. J., Krishna-Raj, S. y Saxena, P. K. 1999. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: The role of thidiazuron and N⁶-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis. Plant Growth. Reg. 28: 9-15.
- Vinterhalter, B. y Neskovic, M. 1992. Factors affecting *in vitro* propagation of quince (*Cydonia oblonga* Mill). J. Hort. Sci. 67:39-43.
- Visser, C., Fletcher, R. A., Saxena, P. K. 1995. Thidiazuron stimulates expansion and greening in cucumber cotyledons. Physiol. Mol. Biol. Plants 1: 21-26.

- Visser, C., Qureshi, J. A., Gill, R. y Saxena, P. K. 1992. Morphoregulatory role of thidiazuron: substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyls cultures. *Plant Physiol.* 99: 1704-1707.
- Vivekananda, J., Drew, M. C. y Thomas, T. L. 1992. Hormonal and environmental regulation of the carrot lea-class gene Dc3. *Plant Physiol.* 100: 576-581.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. y Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 233-249.
- Voyiatzis, C. y Voyiatzis, D. G. 1988. Shoot proliferation of the rose cv (H. T.) Dr Verhage as influenced by apical dominance regulating substances. *Acta Hort.* 226: 671-674.
- Vranová, E., Inzé, D. y Van Breusegen, F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Rev. J. Exp. Bot.* 53, No 352, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants . Special Issue. 1227-1236.
- Walker, M. A., Robert, D. R. Shin, C. Y. y Dumbrof, E. B. 1985. A requirement for polyamines during the cell division phase of radicle emergence in seeds of *Acer saccharum*. *Plant Cell Physiol.* 26: 967-972.
- Wang, C. J., Cheng, T. C., Liu, J. Y., Chou, F. P., Kuo, M. L. y Lin, J. K. 1996. Inhibition of protein kinase C and proto-oncogene expression by crocetin in NIH/3T3 cells. *Mol. Carcinog.* 17: 235-240.
- Wang, Q. C. 1992. The effect of light, darkness and temperature on micropropagation of the pear rootstock BP10030. *J. Hort. Sci.* 67: 869-876.
- Waris, H. 1957. A striking morphogenetic effect of amino acid in seed plant. *Suom Kemistil.* 30B: 121.
- Washko, P. W., Welch, R. W., Dhariwal, K. R., Wang, Y. y Levine, M. 1992. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analysis in biological samples. *Anal. Biochem.* 202: 1-14.
- Watad, A. A., Yun, D. J., Matsumoto, T., Niu, X., Wu, Y., Kononowicz, A. K., Bressan, R. A. y Hasegawa, P. M. 1998. Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Rep.* 17: 262-267.
- Weinstein, L. H. y Galston, A. W. 1988. Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamine biosynthesis. U. S. Patent No 4818770.
- Weissiger, R. A., Fridovich, I. 1973. Superoxide dismutase: Organelle specificity. *J. Biol. Chem.* 248: 3582-3592.
- Welander, M. y Huntrieser, I. 1981. The rooting ability of shoot raised *in vitro* for the apple rootstock A2 in juvenile and adult growth phase. *Physiol Plant.* 53: 301-306.

- Wenck, A. R., Quinn, M., Whetten, R. W., Pullman, G. y Sederoff, R. 1999. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea Abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). Plant Mol. Biol. 39: 407-416.
- Wetherell, D. F. y Dougall, D. K. 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiol. Plant. 37: 97-103.
- White, P. R. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. Am. J. Bot. 40: 517-524.
- Wilde, H. D., Nelson, W. S., Booij, H., De Vries, S. C. y Thomas, T. L. 1988. Gene expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. Planta. 176: 205-211.
- Wurtele, E. S., Wang, H., Durgerian, S., Nikolau, B. J. y Ulrich, T. H. 1993. Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. Plant Physiol. 102: 303-312.
- Wyss-Benz, M., Streit, L. y Ebert, E. 1990. Feruloylputrescine and caffeoylputrescine are not involved in growth and floral bud formation of stem explants from *Nicotiana tabacum* L. var Xanthi nc. Plant Physiol. 92: 924-930.
- Yadav, J. S. y Rajam, M. V. 1997. Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongea* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. J. Exp. Bot. 48: 1537-1545.
- Yadav, J. S. y Rajam, M. V. 1998. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. Plant Physiol. 116: 617-625.
- Ye, B., Muller, HH., Zhang, J. y Gressel, J. 1997. Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conzys bonariensis* and wheat. Plant Physiol. 115: 1443-1452.
- Yeung, E. C. y Law, S. K. 1987. Serial sectioning techniques for a modified LKB Historesin. Stain Technol. 62: 147-153.
- Yimin Fang, M. A., Smith, A. L. y Pepin, M. F. 1999. Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 35: 106-113.
- Yokota, T., Nakayama, M., Harasawa, I., Sato, M., Katsuhara, M. y Kawabe, S. 1994. Polyamines, indole-3-acetic acid and abscisic acid y rice phloem sap. Plant Growth Reg. 15: 125-128.
- Young, N. D. y Galston, A. W. 1983. Putrescine and acid stress: Induction of arginine decarboxylase activity and putrescine accumulation by low pH. Plant Physiol. 71: 767-771.

- Zel, J., Debeljak, N., Uzman, R. y Ravnikar, M. 1997. The effect of jasmonic acid, sucrose and darkness on garlic (*Allium sativum* L. cv. Ptujski jesenski) bulb formation *in vitro*. In *Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 33: 231-235.
- Zimmerman, R. H. y Broome, O. C. 1980. Micropropagation of thornless black-berry. En: Anon 1980(q.v.), pp.23-26
- Zimmerman, R. H. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5: 1411-1423.
- Ziv, M. 1991. Vitrication. En: Debergh, P. y Zimmermann R. eds. *Micropropagation*, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. pp 45-69.
- Ziv, M. 1992a. The use of growth retardants for the regulation and acclimatization of *in vitro* plants. En: Karsen, C. M.; van Loon, L. C.; Vruengdenhill, D., eds. *Progress in plant growth regulation*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp 809-817.
- Ziv, M. 1992b. Morphogenic control of plants micropropagated in bioreactor cultures and its possible impact on acclimatization. *Acta Hort.* 319: 119-124.
- Ziv, M. 1995. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Hort.* 393: 25-38.
- Ziv, M., Kahany, S. y Lilien-Kipnis, H. 1995. Somatic embryos and bulblet development from bioreactor regenerated meristematic clusters of *Nerine*. *Acta Hort.* 393: 203-212.
- Ziv, M. 1999. Organogenic plant regeneration in bioreactors. En: Altman et al. eds. *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. pp 673-676.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Frugis, G., y Chua, N. H. 2002. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 30: 349-353